



UNIVERSIDAD DE BUENOS AIRES

Facultad de Ciencias Exactas y Naturales

Departamento de Química Biológica

**Efecto del tratamiento conjunto con benznidazol y fenofibrato
en la modulación de la disfunción ventricular
y de la respuesta inflamatoria
en la enfermedad de Chagas experimental**

Tesis presentada para optar al título de Doctor de la Universidad de Buenos Aires
en el área Química Biológica

Lic. Ágata Carolina Cevey

Director de tesis: Dra. Nora Beatriz Goren

Consejero de Estudios: Dr. Norberto Zwirner

Lugar de trabajo:

Instituto de Investigaciones en Microbiología y Parasitología Médica (IMPaM). UBA- CONICET.

Instituto de Investigaciones Biomédicas en Retrovirus y SIDA (INBIRS). UBA- CONICET.

Buenos Aires, 2018

Efecto del tratamiento conjunto con benznidazol y fenofibrato en la modulación de la disfunción ventricular y de la respuesta inflamatoria en la enfermedad de Chagas experimental

La enfermedad de Chagas, causada por *Trypanosoma cruzi* (*T. cruzi*), es la principal causa de miocardiopatía dilatada en el continente americano. El tratamiento antiparasitario recae mayormente en benznidazol (Bzl) dado que el otro fármaco utilizado, el Nifurtimox, escasea o no se encuentra disponible en muchos países. Ambos inducen efectos adversos de variada severidad en muchos pacientes, que pueden llevar a la interrupción del tratamiento.

Dado que la aparición de efectos adversos está, en muchos casos, relacionada con la dosis, en el primer capítulo de esta tesis estudiamos la eficacia de Bzl en términos de su actividad parasiticida y antiinflamatoria, usando dosis más bajas que las usualmente reportadas. Ratones BALB/c fueron infectados con la cepa de *T. cruzi* RA, altamente virulenta, y tratados con distintas dosis de Bzl. Se evaluaron la parasitemia, la mortalidad y el peso corporal. La carga parasitaria, el infiltrado tisular y mediadores inflamatorios fueron estudiados en el corazón. La actividad sérica de la creatina kinasa (CK) fue determinada como un marcador de injuria cardíaca. Asimismo, las propiedades antiinflamatorias de Bzl, independientemente de su capacidad parasiticida, fueron evaluadas en un modelo *in vitro* de cardiomiocitos en cultivo estimulados con LPS.

La dosis elegida para el tratamiento fue de 25 mg/kg/día de Bzl. Esta dosis negativizó los parámetros parasitológicos, indujo un significativo descenso de IL-1 β , IL-6 y NOS2 en el corazón y de la actividad sérica de CK, a valores normales. No se observó mortalidad en los ratones tratados. Cultivos primarios de cardiomiocitos tratados con Bzl mostraron disminución de la expresión de mediadores inflamatorios a través de la inhibición de la vía NF- κ B.

Desde el punto de vista funcional, *T. cruzi* induce serias alteraciones cardíacas en la etapa crónica de la enfermedad. La fibrosis y miocardiopatía dilatada y su consecuencia, la insuficiencia cardíaca congestiva, constituyen la principal causa de muerte de pacientes con infección crónica por *T. cruzi*. Este fenómeno se asocia a la

persistencia parasitaria que se acompaña de un intenso infiltrado inflamatorio que, secundariamente, desemboca en remodelación cardíaca con agrandamiento de las cámaras, adelgazamiento parietal y fibrosis intersticial. Los receptores activados por factores de proliferación peroxisomal α (PPAR α), son factores de transcripción dependientes de ligando que participan en la regulación de la inflamación. Esta regulación conlleva la inhibición de la producción de citoquinas y mediadores inflamatorios y la reducción de depósitos de colágeno, modulando la fibrosis en diversas patologías. Por lo tanto, en el segundo capítulo de este trabajo, investigamos si el fenofibrato (Fen), agonista sintético de PPAR α , mejoraba los parámetros inflamatorios y la disfunción ventricular en un modelo murino de infección con *T. cruzi*. Para ello, ratones BALB/c fueron secuencialmente infectados con dos cepas de *T. cruzi* de diferente contexto genético. Bzl 25 mg/kg/día eliminó los parásitos, pero no logró prevenir la patología cardíaca, de manera similar a lo que sucede en la cardiomiopatía chagásica crónica humana. Mediante ecocardiografía Doppler, observamos que el tratamiento con Fen restableció a valores normales el diámetro de fin de sístole, la fracción de eyección y de acortamiento, y el tiempo de relajación isovolumétrico. Además, Fen redujo la inflamación cardíaca y la fibrosis, la expresión de mediadores proinflamatorios (IL-6, TNF- α y NOS2) y de remodelación cardíaca (MMP-9 y CTGF), y disminuyó la actividad sérica de CK. La degradación citosólica de I κ B α fue inhibida por Fen, lo que sugiere que la vía NF- κ B participa de los efectos de Fen.

En síntesis, en esta tesis mostramos que, por un lado, una dosis baja de Bzl ejerce una adecuada actividad parasiticida y antiinflamatoria, llevando a la eliminación de los parásitos y a la recuperación del tejido. Esto puede ser relevante para actualizar la dosis utilizada para el tratamiento de la enfermedad de Chagas humana, minimizando los efectos adversos.

Asimismo, nuestros resultados demuestran que el tratamiento combinado de Fen y Bzl elimina los parásitos y revierte la disfunción ventricular asociada a la respuesta inflamatoria y fibrótica, en un modelo experimental de la enfermedad de Chagas.

Palabras clave: *Trypanosoma cruzi*; disfunción ventricular; PPAR α ; Fenofibrato; Benznidazol; mediadores inflamatorios

Treatment with fenofibrate plus a low dose of benznidazole in the modulation of ventricular dysfunction and inflammatory response in an experimental model of Chagas disease

Chagas disease, caused by *Trypanosoma cruzi*, is the main cause of dilated cardiomyopathy in the Americas. Antiparasitic treatment mostly relies on benznidazole (Bzl) due to Nifurtimox shortage or unavailability. Both induce adverse drug effects (ADE) of varied severity in many patients, leading to treatment discontinuation or abandonment.

Since dosage may influence ADE, in the first part of this thesis we aimed to assess Bzl efficacy in terms of parasitocidal and antiinflammatory activity, using doses lower than those previously reported for acute mouse model. BALB/c mice, infected with the *T. cruzi* RA strain, were treated with different doses of Bzl. Parasitaemia, mortality and weight change were assessed. Parasite load, tissue infiltrates and inflammatory mediators were studied in the heart. Serum creatine kinase (CK) activity was determined as a marker of heart damage. The infection-independent antiinflammatory properties of Bzl were studied in an *in vitro* model of LPS-treated cardiomyocyte culture.

The chosen dose for the treatment was 25 mg/Kg/day Bzl. This dose turned negative the parasitological parameters, induced a significant decrease in IL-1 β , IL-6 and NOS2 in the heart and returned serum CK activity to normal levels. No mortality was observed in infected benznidazole-treated mice. Primary culture cardiomyocytes treated with Bzl showed that inflammatory mediators were reduced via inhibition of the NF- κ B pathway.

Besides, *T. cruzi* induces serious cardiac alterations during the chronic infection. Fibrosis and dilated cardiomyopathy, and its consequence, the congestive heart failure, are the main cause of death in patients with chronic infection with *T. cruzi*. This phenomenon is associated to the parasite persistence that is accompanied by an intense inflammatory infiltrate, which secondarily leads to cardiac remodeling with enlarged chambers, parietal thinning and interstitial fibrosis.

Peroxisome proliferator-activated receptors (PPAR)- α , are ligand-dependent transcription, that participate in the regulation of inflammation. This regulation involves the inhibition of production of proinflammatory cytokines and mediators, and to the reduction of collagen deposits modulating the fibrosis in diverse pathologies. Thus, in the second part of this work, we investigated whether the PPAR- α agonist, fenofibrate (Fen), improves cardiac function and inflammatory parameters in a murine model of *T. cruzi* infection. BALB/c mice were sequentially infected with two *T. cruzi* strains of different genetic background. Bzl 25 mg/Kg/day cleared parasites but did not preclude cardiac pathology, resembling what is found in human chronic chagasic cardiomyopathy. Through echocardiography, we observed that Fen treatment restored to normal the ejection and shortening fractions, left ventricular end-systolic diameter, and isovolumic relaxation time. Moreover, it reduced cardiac inflammation and fibrosis, decreased the expression of proinflammatory (IL-6, TNF- α and NOS2) and heart remodeling mediators (MMP-9 and CTGF), and reduced serum creatine kinase activity. The fact that I κ B α cytosolic degradation was inhibited by Fen suggests that the NF κ B pathway has a role in its effects.

Summarizing, in this work we show that a Bzl dose lower than that previously reported for treatment of experimental Chagas disease, exerts adequate antiparasitic and antiinflammatory effects leading to parasite clearance and tissue healing. This may be relevant to reassess the dose currently used for the treatment of human Chagas disease, aiming to minimize ADE.

Moreover, we demonstrate that combined treatment with Fen plus Bzl is able both to reverse the cardiac dysfunction associated with the ongoing inflammatory response and fibrosis and to attain parasite clearance in an experimental model of Chagas disease.

Keywords: *Trypanosoma cruzi*; heart dysfunction; PPAR α ; Fenofibrate treatment; Benznidazole, inflammatory mediators

AGRADECIMIENTOS

*“El mundo es eso - reveló-. Un montón de gente, un mar de fueguitos.
Cada persona brilla con la luz propia entre todas las demás.
No hay dos fuegos iguales.
Hay gente de fuegos grandes y fuegos chicos y fuegos de todos los colores.
Hay gente de fuego sereno, que ni se entera del viento,
y gente de fuego loco, que llena el aire de chispas;
algunos fuegos, fuegos bobos, no alumbran ni queman,
pero otros arden la vida con tantas ganas
que no se puede mirarlos sin parpadear,
y quien se acerca
se enciende”*

Eduardo Galeano. 1989

“Las palabras nunca alcanzan cuando lo que hay que decir desborda el alma”. Julio Cortázar.

“Cuando tienes una familia que deja que te expreses como eres, es lo mejor que te puede dar la vida”.
Rosario Flores.

En primer lugar, a Mamá. Por el amor, por la incondicionalidad. Por enseñarme el valor de aprender a elegir, y por acompañarme siempre en todas y cada una de mis decisiones. Por enseñarme a ver y a comprender el aprendizaje detrás de cada error. Por creer en mí aun cuando yo no pude. Por alentarme siempre a seguir. Por todo el esfuerzo, por tener siempre las palabras justas. Por las charlas, por el arte, por la filosofía, por contagiarme el amor por saber, por investigar... por llenar mi vida de poesía. Porque sin tu esfuerzo esto no habría sido posible, este logro también es tuyo. Te amo!!

A Jorge, por haber sido como un padre para mí. A Lita, por su enorme cariño.

A todos los De Laforé. Especialmente, a la tía Stella, el tío Fafe y el tío Ati, a mis hermosos y genios primos Artu, Vani y Male, Rober y Raquel, Jorge, Maru, Lucía, Pablo, y a mis amados sobrinos Sofi, Zuqui, Lucho, Lauti y Mili. Por apoyarme siempre, por emocionarse con mis logros y estar siempre que los necesité. Por llenar mi vida de arte y alegría, y sobre todo de mucho amor!!!

A la familia que se elige:

A mi madrina Josefina. Por su amor, su ayuda incondicional, por la protección. A todos los Noble y compañía, por estar siempre en todos los momentos, gracias por el cariño y la alegría de siempre!

A mis tíos del corazón de Mar del Plata, por ser los mejores, siempre presentes aunque a la distancia (y no tanto): Claudia, José, Tizi, Cachi, Carlos Polla, Irma, Carlos Lorenzo, Euge y el pequeño Ian, Osvaldo, Kelmis, Iván y toda la banda! Los quiero!!

A Luis, por su gran ayuda y contención estos últimos años.

A Rubén, por ser un gran médico, por la contención y el apoyo, por las largas charlas sobre Chagas.

A Silvia y Fortu, por estar siempre presentes, en los buenos y no tan buenos momentos.

A Silvia y Amelia, por estar siempre que las necesité, porque más de una vez me han salvado la vida.

“Elige un trabajo que te guste y no tendrás que trabajar ni un día de tu vida”. Confucio

A la Dra. Nora Goren. Nora, fuiste durante todos estos años mucho más que mi directora de Tesis. Gracias por la confianza, por la paciencia, por todo el aprendizaje. Por enseñarme incluso cuando no creíste estar haciéndolo. Por el apoyo incondicional. Por estar siempre dispuesta a escuchar mis ideas. Por todos los consejos, profesionales y personales, por las charlas, los almuerzos, los grandes debates. Pero sobre todo, gracias por el cariño de siempre, desde el primer día. Gracias por hacer de mi paso por el doctorado, una etapa hermosa de aprendizaje y de reforzar mi amor por la ciencia. Te quiero mucho!

Al Sr. Dr. Investigador Federico Penas. Fede querido, todo lo que pueda decirte, es poco. No hay persona más afortunada que yo al tenerte de compañero, colega y amigo todos estos años. Por la enseñanza, por tu humildad, por esa ingenuidad que solo te hace ser mejor persona cada día, pero que a veces me desquicia. Por haberme escuchado, todo, siempre. Por mirar conmigo protocolos eternos (o muy sencillos), porque siempre *“dos piensan mejor que uno”*. Por venir fines de semana a ayudarme, sin que te lo pida. Por saber siempre lo que estoy por decir, por las risas, por la música, por los consejos, por ser mi confidente y bancarnos las catarsis eternas (y altamente repetitivas), pero tan necesarias. Por ser quien me baja a la tierra cuando me está queriendo ganar la emoción, por hacerme ver siempre lo mejor en todo. Por ser el mejor abogado del diablo que se puede pedir. Por hacer cientos de experimentos juntos, pero cada uno con sus cosas. Por ser un gran, gran compañero con el que me encanta trabajar, porque trabajar con un amigo es una de las cosas más lindas de la vida. Te quierooooo Federrickennn!!!! Gracias Totales!!!

Al Dr. Gerardo Mirkin. Ger, Gracias por enseñarme a trabajar de la mejor manera con ratones, y con material infectado. Por todo lo que me enseñaste, y me seguís enseñando, de histología, de inmunología y de tantas cosas más. Por la generosidad en compartir tu conocimiento infinito. Por la vehemencia de tus convicciones. Por siempre estar dispuesto a dar una mano. Por tu pasión por la ciencia, que contagia. Te quiero mucho!

A todas los que forman y han formado parte en algún momento de este hermoso grupo de trabajo. A Jime, por el último tiempo compartido. A Sofi y Marce, por la alegría que contagian, por no perderse aunque sigamos caminos diferentes. A Eugenia, por haberme enseñado todo lo que sabía de cultivos primarios y biología molecular, pero sobre todo, por enseñarme el arte de manejar el tiempo.

“Cada amigo representa un mundo dentro de nosotros, un mundo que tal vez no hubiera nacido si no lo hubiéramos conocido”. Anaïs Nin

A Mica, por ser para mí como una hermana que me regaló la vida. Por haber compartido la carrera desde su comienzo, por pelearla siempre, porque no nos regalaron nada. Porque la vida va pasando y nos encuentra siempre consiguiendo lo que a alguna vez soñamos llegar. Porque tuvimos dudas, pero fueron más las certezas. Porque aunque nos separan miles de kilómetros, nos une el cariño. Porque sigamos brindando por nuevos logros, porque siempre vamos por más!!

A toda la banda loca de exactas, Pau, Marian, Celes, Emi y Aili, por no perdernos aunque estemos desperdigados por América. Por tres hermosas pequeñas de la nueva generación, Juani, Charo e Isa.

A Aleh, mi amiga matemática, loca, brillante, por estar siempre presente, en todo momento. Porque pensamos distinto en miles de cosas, pero siempre nos une la pasión por investigar, y por bailar, y por hablar cada vez más fuerte hasta desgarrantarnos de risa!!!

A Andrea, amiga querida!! Por las infinitas horas de terapia en el cuarto de cultivo, por estar siempre, aunque lejos, cerca. Porque a los pasillos del IMPaM le faltan nuestros “amigaaaaaaaaaaaa” de cada lado, por todos los consejos de la ciencia y de la vida, por las risas infinitas!!

A David, por haber estado estos años, siempre dispuesto a dar más manos de las que pude aceptar. Por todas las charlas, los debates, por enseñarme a ver las cosas de un modo distinto que a veces me cuesta ver. Por tu incondicionalidad, y sobre todo, por los memes!!

A Pau y Devi, dos seres inmensos que me llenan de alegría!! Por su cariño permanente, por las charlas eternas, por todos los té compartidos, por el arte, por estar. Porque el oeste tiene agite!!

A Dani, por bancar las catarsis y siempre estar pendiente, ofreciendo ayuda a cada paso!! Por los consejos y estar presente todos los días!!

“Las cosas están bien cuando marchan en conjunto, no aisladamente”. Silo

Este trabajo de tesis no hubiera sido posible sin la colaboración de muchas personas, que en mayor o menor medida, me ayudaron en alguna parte del camino:

Un muy especial agradecimiento a todo el personal del bioterio, en particular a Vale, Sabri y Vero, por su paciencia y siempre buena predisposición para todo.

A Ricardo y Eduardo, por su gran ayuda en las infecciones de los ratones y las mediciones de las parasitemias.

Al Dr. Martín Donato y al Dr. Ricardo Gelpi, por su invaluable colaboración en la realización de ecocardiografías en los ratones. Martín, gracias por la paciencia, por enseñarme los pormenores de cómo funciona el corazón, por la seriedad con la que haces el trabajo, siempre impecable!

A Diego y Javi, por toda la ayuda en la toma de las microfotografías de las inmunocitoquímicas! Por la siempre buena predisposición de pasar horas en el microscopio!

A la Dra. Celentano, por todas las tardes compartidas mientras trataba ratones, por los consejos y por estar siempre dispuesta a ayudarme!!

A la Dra. María E. Sales y todo el grupo del CEFyBO, por compartir los seminarios de los viernes, por todas las ideas, los consejos, las críticas siempre constructivas y las palabras de aliento.

A la Dra. Marisa Gómez, por su constante colaboración y predisposición. A todo el grupo MIG, por estar siempre para dar una mano, por compartir horas en cultivo, en los pasillos, en la vida misma!

A la Dra. Mariana Catalano y su grupo, por estar siempre dispuesta a ayudarme. Por ser compañeras de pasillo cuando trabajábamos hasta muy tarde!! A Gera y Nico, por enseñarme la técnica de obtención de ADN genómico y facilitarnos reactivos, protocolos y truquitos. Por las tardes de coro mientras medía actividad de enzimas, muchas gracias y sunngaligaligali!!

A todos los grupos de investigación con los que realizamos colaboraciones, por el flujo de ideas, porque cooperar con otros siempre te abre la mente!

A Nury, por ser la mejor profe de inglés, por la paciencia y toda la enseñanza.

Al Dr. Norberto Zwirner por haber aceptado ser mi consejero de tesis doctoral. Por haber cumplido su función de la mejor manera, por haberse tomado el tiempo de leer cuidadosamente todo lo que le enviaba y haberme dado muy buenos aportes. Además, por formar parte del comité de seguimiento de tesis junto con la Dra. Belaunzarán y la Dra. Lombardi, por todos sus consejos y recomendaciones.

Al becario del Piso 12, por todo lo compartido estos 5 años, los festejos, las catarsis y las largas jornadas laborales. En las buenas siempre, en las malas más!!

A toda la gente del Piso 13, por haber compartido almuerzos y experimentos, por las charlas de ciencia y de la vida, por los debates eternos y las charlas de pasillo.

A la Dra. Gonzalez-Cappa, por sus consejos, por contagiar su amor por la ciencia, por todas las anécdotas e historias de vida, por haber estado siempre presente en todo este camino.

Al becario del INBIRS, por haberme hecho sentir parte al instante, por la alegría que desprenden, porque es imposible no pasarla bien con ustedes! Porque no faltan las charlas de ciencia, pero tampoco de la vida. Por haberme alentado este último tiempo, con la mejor predisposición para todo!

Quiero agradecer especialmente al Departamento de Microbiología, Parasitología e Inmunología de la Facultad de Medicina de la Universidad de Buenos Aires, y al Instituto de Investigaciones en Microbiología y Parasitología Médica (IMPaM), por haber sido el lugar donde desarrollé la mayor parte de esta tesis doctoral. Al Dr. Horacio Salomón y a todo el Instituto de Investigaciones Biomédicas en Retrovirus y SIDA, que no solo nos han recibido para formar parte del Instituto, sino que además desde el comienzo de mi tesis nos han permitido utilizar equipamiento para el desarrollo de muchos experimentos. Al CONICET, por haberme otorgado la Beca Interna Doctoral, y a los subsidios otorgados al grupo de trabajo por la UBA, la Agencia Nacional de Ciencia y Tecnología y el CONICET que me permitieron desarrollar este proyecto, muchas gracias!

Por último, al Dr. Juan Gagliardi, Dr. Ricardo Corral y Dra. Susana Laucella, por haber aceptado evaluar este trabajo de tesis.

“Una felicidad no compartida no es felicidad”

Borís Pasternak

A todos,

MUCHAS GRACIAS!!

A Mamá

PUBLICACIONES RELACIONADAS AL TRABAJO DE TESIS

1- TREATMENT WITH FENOFIBRATE PLUS A LOW DOSE OF BENZNIDAZOLE ATTENUATES CARDIAC DYSFUNCTION IN EXPERIMENTAL CHAGAS DISEASE

Ágata C. Cevey, Gerardo A. Mirkin, Martín Donato, María J. Rada, Federico N. Penas, Ricardo J. Gelpi, Nora B. Goren.

International Journal for Parasitology: Drugs and Drug Resistance. Elsevier. 7 (3). p378-387. 2017.

2- LOW-DOSE BENZNIDAZOLE TREATMENT RESULTS IN PARASITE CLEARANCE AND ATTENUATES HEART INFLAMMATORY REACTION IN AN EXPERIMENTAL MODEL OF INFECTION WITH A HIGHLY VIRULENT *TRYPANOSOMA CRUZI* STRAIN

Ágata C. Cevey, Gerardo A. Mirkin, Federico N. Penas, Nora B. Goren.

International Journal of Parasitology: Drugs and Drug Resistance. Elsevier. 6 (1). p12-22. 2016.

OTRAS PUBLICACIONES

1- HEPATIC INJURY ASSOCIATED WITH *TRYPANOSOMA CRUZI* INFECTION IS ATTENUATED BY TREATMENT WITH 15-DEOXY-12,14 PROSTAGLANDIN J2

Federico N. Penas* - **Ágata C. Cevey***; Sofía Siffo; Gerardo A. Mirkin; Nora B. Goren.

*** Estos autores contribuyeron igualmente al trabajo.**

Experimental Parasitology. Academic Press Inc Elsevier Science. 170. p100 - 108.2016

2- EFFECT OF A NEW PPAR γ AGONIST ON ANGIOGENESIS AND INFLAMMATORY MEDIATORS IN HEART OF *T. CRUZI* INFECTED MICE. PARTICIPATION OF MACROPHAGES

Federico N. Penas, Davide Carta, Ganna Dmytrenko, Gerardo A. Mirkin, **Ágata C. Cevey**, Jimena Rada, Maria Grazia Ferlin, María E. Sales, Nora B. Goren.

Frontiers in Immunology, Inflammation Section. Frontiers. 11 (8). p1738. 2017

3- PPAR α AND PPAR γ LIGANDS DRIVE THE POLARIZATION FROM M1- TO M2-TYPE MACROPHAGES WITH ANTI-INFLAMMATORY PROPERTIES IN *TRYPANOSOMA CRUZI*-INFECTED MICE

Federico N. Penas, Marcela Vera, Gerardo A. Mirkin, **Ágata C. Cevey**, María E. Sales and Nora B. Goren.

BBA - Molecular Basis of Disease. Elsevier. 1852. p893–904. 2015

4- PPAR γ LIGAND TREATMENT INHIBITS CARDIAC INFLAMMATORY MEDIATORS IN BOTH ACUTE AND CHRONIC MOUSE MODELS OF *TRYPANOSOMA CRUZI* INFECTION

Federico N. Penas, Gerardo A. Mirkin, Eugenia Hovsepian, **Ágata C. Cevey**, María E. Sales and Nora B. Goren.

BBA - Molecular Basis of Disease. Elsevier. 1832. p239–248. 2013

ADN	Ácido Desoxiribonucleico
ADNc	ADN Complementario
ANMAT	Administración Nacional De Medicamentos, Alimentos Y Tecnología Médica
ARN	Ácido Ribonucleico
ARNm	ARN Mensajero
Bzl	Benznidazol
BSA	Albúmina Sérica Bovina
CaCl₂	Cloruro De Calcio
CICUAL	Comité Institucional Para El Cuidado Y Uso De Animales De Laboratorio
CK	Creatina Kinasa
CO₂	Dióxido De Carbono
COX2	Ciclooxigenasa 2
CTGF	Factor De Crecimiento De Tejido Conectivo
DAPI	4,6-Diamino 2-Fenil-Indol
DDVI	Diámetro De Fin De Diástole Del Ventriculo Izquierdo
DNAasa	Deoxiribonucleasa
DNDi	Drugs For Neglected Diseases Initiative, Medicamentos Para Enfermedades Desatendidas
dNTP	Deoxinucléotido Trifosfato
dpi	Días Post Infección
DSVI	Diámetro De Fin De Sístole Del Ventriculo Izquierdo
DTT	Ditiotreitol
EDTA	Ácido Etilendiaminotetraacético
EGTA	Ácido Bis(2-Aminoetil) Etilenoglicol-Tetraacético
ELISA	Ensayo Por Inmunoabsorción Ligado A Enzimas
ERN	Especies Reactivas Del Nitrógeno
ERO	Especies Reactivas Del Oxígeno
ERK	Quinasa Regulada Por Señales Extracelulares
FA	Fraccion De Acortamiento
FDA	Food And Drug Administration, Administración De Alimentos Y Fármacos
FE	Fraccion De Eyeccion
Fen	Fenofibrato
FITC	Isotiocianato De Fluoresceína
FNa	Fluoruro De Sodio
h	Hora
H₂O₂	Peróxido De Hidrógeno
HBSS	Solución Salina De Hanks
HRP	Peroxidasa De Rábano Picante
i.d.p	Intradermopltantar
i.p.	Intraperitoneal
IgG	Inmunoglobulina G

IKK	Quinasa De Ikb
IL	Interleuquina
INF-γ	Interferon Gamma
IκB	Inhibidor Del Factor NF-κB
KCl	Cloruro De Potasio
kDa	Kilodalton
Kg	Kilogramo
KH₂PO₄	Fosfato De Potasio Monobásico
LPS	Lipopolisacárido
mA	Miliamperio
MAPK	Proteín Quinasas Activada Por Mitógeno
mg	Miligramo
MgCl₂	Cloruro De Magnesio
MgSO₄	Sulfato De Magnesio
MHT	Microhematocrito
MHz	Megahercio
min	Minuto
ml	Mililitro
mM	Milimolar
MML-V	Virus Murino De Leucemia Moloney
MMP	Metaloproteasa De La Matriz
ms	Milisegundo
NaCl	Cloruro De Sodio
NADP⁺	Nicotinamida Adenina Dinucleótido Fosfato
NaHCO₃	Bicarbonato De Sodio
NaNO₂	Nitrito De Sodio
Na₃VO₄	Ortovanadato De Sodio
Na₂HPO₄	Fosfato Ácido Disódico
ND	No Detectable
NF-κB	Factor Nuclear -κB
NIH	Instituto De Salud De Los Estados Unidos
nm	Nanómetro
nM	Nanomolar
NO	Óxido Nítrico
NOS	Óxido Nítrico Sintasa
ns	No Significativo
OMS	Organización Mundial De La Salud
PAGE	Electroforesis En Gel De Poliacrilamida
PBS	Buffer Fosfato Salino
PCR	Reacción En Cadena De La Polimerasa

p.i	Post Infección
pg	Picogramo
pM	Picomolar
PMADs	Patrones Moleculares Asociados A Daño
PMAPs	Patrones Moleculares Asociados A Patógenos
PMN	Polimorfonucleares
PMSF	Fenil Metil Sulfonil Fluoruro
PPAR	Receptores Activados Por Factores De Proliferación Peroxisomal
PPRE	Elementos De Respuesta A PPAR
PVDF	Polifluoruro De Vinilideno
qPCR	PCR Cuantitativa Y A Tiempo Real
RNAse	Ribonucleasa
rpm	Revoluciones Por Minuto
RT-qPCR	Reacción En Cadena De La Polimerasa Cuantitativa En Transcripción Reversa
RXR	Receptor Del Ácido Retinoico
s	Segundo
SENASA	Servicio Nacional De Sanidad Y Calidad Agroalimentaria
SDS	Duodecil Sulfato De Sodio
SFB	Suero Fetal Bovino
spi	Semanas Post Infección
<i>T. cruzi</i>	<i>Trypanosoma Cruzi</i>
TGF-β	Factor De Crecimiento Transformante Beta
TLR	Receptores Tipo Toll
Tm	Temperatura De Fusión
TNF-α	Factor De Necrosis Tumoral Alpha
TLR	Receptor Tipo Toll
Treg	Células T Regulatorias
Tris	Tris-(Hidroximetil)-Aminometano
TRIV	Tiempo De Relajación Isovolumétrica
UDT	Unidad Discreta De Tipificación
VI	Ventrículo Izquierdo
Wb	Western blot
μg	Microgramo
μm	Micrometro
μM	Micromolar
15dPGJ2	15-Deoxi-Prostaglandina-J2

ÍNDICE

ÍNDICE DE CONTENIDOS

INTRODUCCIÓN	1
ENFERMEDAD DE CHAGAS	2
Características generales	2
Epidemiología en países endémicos y no endémicos	2
Agente etiológico	4
Vías de transmisión.....	6
<i>Vertical o congénita</i>	7
<i>Transfusional o por trasplante de órganos</i>	7
<i>Oral</i>	7
<i>Accidente laboral</i>	7
Diversidad biológica de <i>Trypanosoma cruzi</i>	8
<i>Cepa RA</i>	9
<i>Cepa CA I, clon K98</i>	9
Fases de la enfermedad de Chagas	9
Tratamiento con benznidazol	10
FISIOPATOLOGÍA CARDIOVASCULAR	14
El ciclo cardíaco.....	14
Cardiopatía chagásica crónica	17
RESPUESTA PROINFLAMATORIA Y PROFIBRÓTICA EN LA INFECCIÓN CON <i>T. CRUZI</i>	19
Marcadores proinflamatorios.....	19
<i>Citoquinas</i>	20
<i>Especies reactivas: Óxido nítrico</i>	21
Marcadores profibróticos	22
La enfermedad de Chagas como una patología inflamatoria.....	23
RESOLUCIÓN DE LA INFLAMACIÓN.....	25
Receptores Activados Por Factores De Proliferación Peroxisomal (PPAR)	25
Fenofibrato: Ligando sintético de PPAR α	26
PPAR α y la modulación de la respuesta inflamatoria y fibrosis	27

OBJETIVOS	30
MATERIALES Y MÉTODOS	32
REACTIVOS.....	33
RATONES Y PARÁSITOS.....	34
MODELOS <i>IN VIVO</i> DE INFECCIÓN CON <i>TRYPANOSOMA CRUZI</i>	34
Modelo de infección letal con una cepa altamente virulenta de <i>T. cruzi</i>	34
Modelo de infección no letal con el clon K98 de <i>T. cruzi</i>	35
Modelo de infección no letal con la población RA de <i>T. cruzi</i>	35
Modelo de infección mixta con dos cepas de <i>T. cruzi</i>	36
MODELOS <i>IN VITRO</i>	37
Cultivo primario de células cardíacas a partir de ratones neonatos.....	37
Obtención de tripomastigotes sanguíneos de <i>T. cruzi</i> para infección <i>in vitro</i>	37
Infección de células en cultivo con <i>T. cruzi</i>	38
Determinación de la concentración parasitocida de Bzl	38
Ensayo para evaluar los efectos de fenofibrato en mediadores inflamatorios	38
Estimulación de células en cultivo con LPS.....	38
Evaluación de los efectos de benznidazol sobre mediadores inflamatorios.....	39
Tiempos de exposición de las células cardíacas a <i>T. cruzi</i> y/o LPS.....	39
DETERMINACIÓN DE PARASITEMIA Y SUPERVIVENCIA.....	39
ECOCARDIOGRAFÍA DOPPLER.....	39
HISTOLOGÍA	40
OBTENCIÓN DE ADN GENÓMICO	40
GENERACIÓN DE ESTÁNDARES DE PCR	41
OBTENCIÓN DE ARN TOTAL Y RETROTRANSCRIPCIÓN A ADN COMPLEMENTARIO.....	41
REACCIÓN EN CADENA DE LA POLIMERASA (qPCR y RT-qPCR).....	41
PREPARACIÓN DE EXTRACTOS PROTEICOS	43
Obtención de extractos citosólicos y nucleares	43
Obtención de extractos totales	43
CUANTIFICACIÓN DE PROTEÍNAS	44
ANÁLISIS DE PROTEÍNAS POR WESTERN BLOT	44
DETERMINACIÓN DE LOS NIVELES NITRITOS/NITRATOS.....	45
ENSAYO POR INMUNOABSORCIÓN LIGADO A ENZIMAS (ELISA)	45

INMUNOCITOQUÍMICA.....	45
EVALUACIÓN DE LA ACTIVIDAD SÉRICA DE CREATINA KINASA	46
COMPOSICIÓN DE SOLUCIONES <i>BUFFER</i>	46
ANÁLISIS ESTADÍSTICOS.....	47
RESULTADOS.....	48
CAPÍTULO 1. EFICACIA PARASITICIDA DE BAJAS DOSIS DE BENZNIDAZOL, EN UN MODELO MURINO DE INFECCIÓN CON UNA CEPA DE ALTA VIRULENCIA DE <i>TRYPANOSOMA CRUZI</i> ..	
Estudio de la eficacia parasiticida de bajas dosis de benznidazol	49
Evaluación de los efectos de bajas dosis de benznidazol sobre la respuesta inflamatoria cardíaca y la actividad sérica de Creatina Kinasa.....	51
Estudio de las propiedades antiinflamatorias de bajas dosis de Bzl en un modelo <i>in vitro</i> de células cardíacas murinas.....	55
Evaluación del papel de la vía NF- κ B en los efectos antiinflamatorios de Bzl, en cardiomiocitos estimulados con LPS.....	59
CAPÍTULO 2. EFICACIA DEL TRATAMIENTO CONJUNTO DE BENZNIDAZOL Y FENOFIBRATO EN LA DISFUNCIÓN VENTRICULAR E INFLAMACIÓN CARDÍACA EN UN MODELO MURINO DE INFECCIÓN MIXTA CON <i>TRYPANOSOMA CRUZI</i>	
Caracterización de la disfunción ventricular en el modelo de infección.....	61
Evaluación del efecto del tratamiento conjunto sobre la disfunción ventricular y el parasitismo tisular.	66
Evaluación del efecto del tratamiento conjunto sobre la respuesta inflamatoria cardíaca.....	72
Evaluar el efecto del tratamiento conjunto sobre la fibrosis y la remodelación cardíaca en ratones infectados con <i>Trypanosoma cruzi</i>	75
Participación de la vía NF- κ B en los efectos ejercidos por fenofibrato, en cardiomiocitos infectados con <i>Trypanosoma cruzi</i>	76
DISCUSIÓN.....	79
CONCLUSIONES.....	89
BIBLIOGRAFÍA	91

INTRODUCCIÓN

*“Não vai demorar que passemos adiante uma grande e bela
ciência, que faz arte em defesa da vida”*

Carlos Chagas. 1928

*“Se dice allí que soy un sabio, pero no existen más sabios. (...)
Hubiera preferido que se dijera que soy un hombre
tesoneramente dedicado a una disciplina circunscripta
y en la cual hago lo posible en no dar paso para atrás”.*

Salvador Mazza, 1944.

ENFERMEDAD DE CHAGAS

Características generales

La enfermedad de Chagas es causada por la infección con el parásito intracelular obligado *Trypanosoma cruzi* (*T. cruzi*). Según la Organización Mundial de la Salud, y al igual que otras enfermedades tropicales desatendidas, "*la enfermedad de Chagas es un indicador de pobreza y desventaja*" (WHO - World Health Organization, 2010). Se trata de una enfermedad infecciosa y sistémica, transmitida por varias especies de triatomíneos hematófagos y sostenida por más de setenta géneros de mamíferos que actúan como reservorios, entre los cuales se encuentra el ser humano.

Fue descrita por primera vez en 1909 por el médico brasileño Carlos Chagas, quien se destaca en los anales de la medicina tropical por ser el único investigador que ha descrito una nueva enfermedad infecciosa en todos sus aspectos: el patógeno que la causa, el vector que la transmite, el ciclo vital del parásito, sus reservorios naturales, y los signos clínicos de la enfermedad (Chagas, 1909). En Argentina fue el médico Salvador Mazza quién estuvo a cargo de estudiar y confirmar los vectores, hospederos, la epidemiología y patogénesis de la enfermedad durante las décadas del '30 y '40. Además, diagnosticó varios cientos de casos y confirmó el carácter endémico de la enfermedad (Mazza, 1934, 1943; Mazza S, Montana A, 1936).

Las opciones terapéuticas no están siempre disponibles y no son del todo satisfactorias, dando lugar a que aproximadamente 20.000 personas con enfermedad de Chagas mueran cada año por problemas cardíacos en zonas endémicas (Tanowitz et al., 2009), y sea una de las causas más comunes de cardiomiopatía no isquémica en América Latina (Trachtenberg et al., 2017).

Epidemiología en países endémicos y no endémicos

La infección por *T. cruzi* es endémica en gran parte del continente americano (Figura 1) y la padecen personas que generalmente viven en áreas rurales, en condiciones desfavorables y en viviendas precarias invadidas por vectores domiciliarios (Nunes et al., 2013).

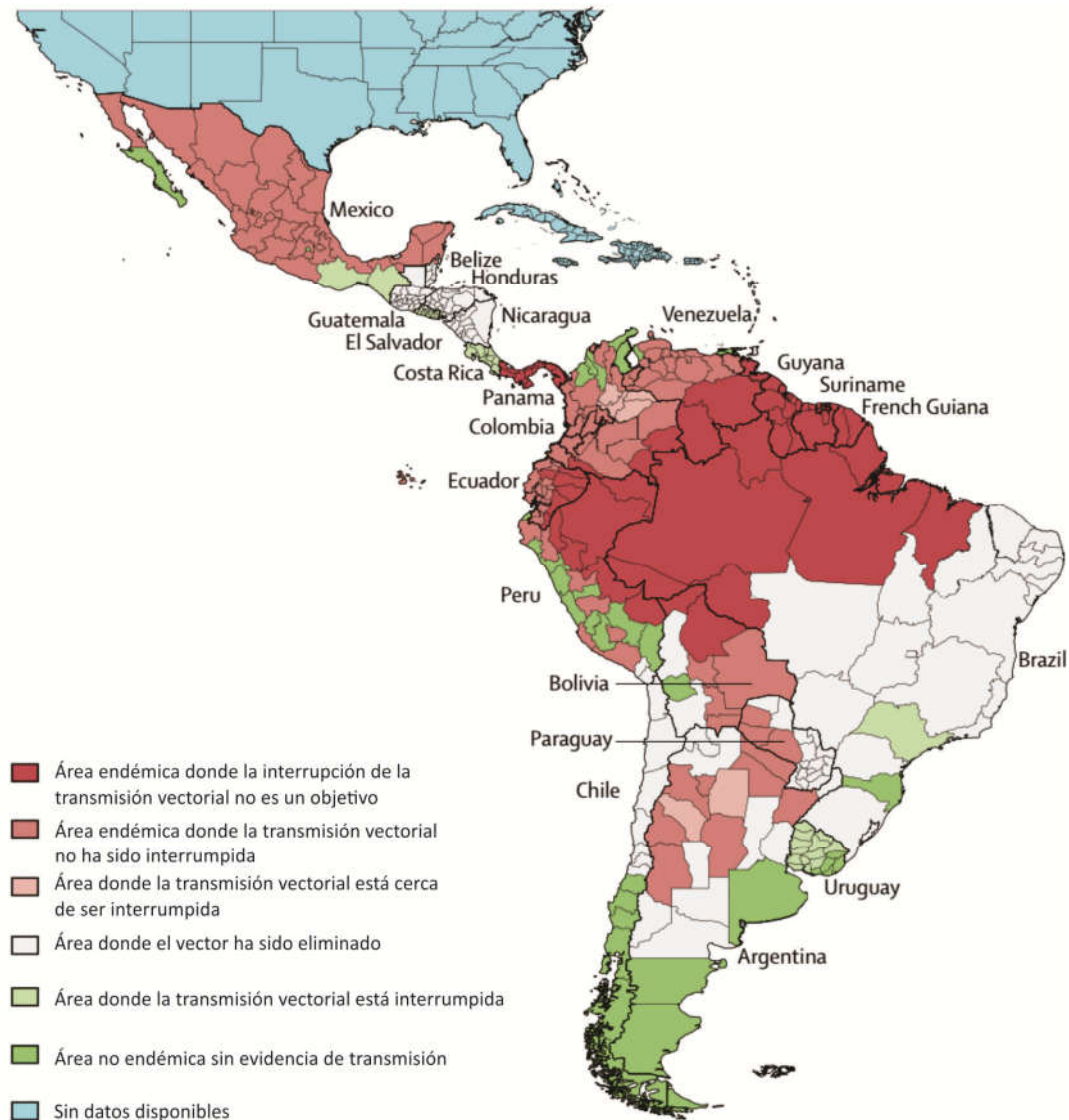


Figura 1. Mapa epidemiológico de la enfermedad de Chagas en América. (Adaptado de Pérez-Molina & Molina, 2017)

Las estimaciones indican que cerca de 90 millones de personas se encuentran en riesgo de infectarse y existen más de 8 millones de personas infectadas en todo el mundo (WHO - World Health Organization, 2017).

Debido a las grandes olas de migración, un gran porcentaje de personas llevan la infección hacia zonas no endémicas como América del Norte (Bern et al., 2009) y Europa (Antinori et al., 2017; Monge-Maillo et al., 2017). Esto ha dado lugar a que la enfermedad se transforme en una temática importante de la salud pública en regiones de mundo sin transmisión vectorial (Schmunis et al., 2010; Traina et al., 2016), con un gran número de personas infectadas (Figura 2).

Debido a la gran diversidad de ambientes a los que se exponen, los tripanosomátidos cambian de estadio durante su ciclo de vida, tanto en los vectores como en los mamíferos. Un mamífero infectado alberga tripomastigotes en su torrente sanguíneo. Estos poseen un núcleo central y un kinetoplasto que se encuentra desplazado posteriormente con respecto al núcleo. El flagelo forma una membrana ondulante a lo largo del soma del parásito y emerge libre por su extremo anterior.

Cuando el vector hematófago ingiere los tripomastigotes sanguíneos de un mamífero infectado, estos migran hacia el intestino medio del insecto. Allí se diferencian a epimastigotes, que se caracterizan por tener un kinetoplasto anterior al núcleo e incipiente membrana ondulante, y se multiplican por fisión binaria. Luego de varios ciclos de división, se desplazan hacia el intestino posterior y el recto, donde se diferencian a tripomastigotes metacíclicos que son liberados con las heces del vector. El insecto puede picar al hospedador mamífero en la piel o en la conjuntiva, a la vez que libera las heces contaminadas. La entrada de los tripomastigotes metacíclicos al hospedador se produce al frotar o rascarse la herida de la picadura o a través de superficies permisivas como las mucosas. Luego de su ingreso, infectan células en la puerta de entrada. Al ingresar a las células, los tripomastigotes se diferencian a amastigotes, que son formas redondeadas de aproximadamente 4-5 μm de diámetro, poseen un núcleo y un kinetoplasto del cual se forma el flagelo externo muy corto o inexistente. Estas formas se localizan en el citoplasma de las células infectadas, en el que se multiplican por fisión binaria. Luego de varios ciclos de división, se diferencian a tripomastigotes sanguíneos, los cuales son liberados por la ruptura de las membranas plasmáticas de las células infectadas. Los tripomastigotes circulan por el torrente sanguíneo del mamífero, y el ciclo se completa cuando un insecto hematófago ingiere sangre del hospedero infectado (**Figura 4**) (Pérez-Molina et al., 2017).

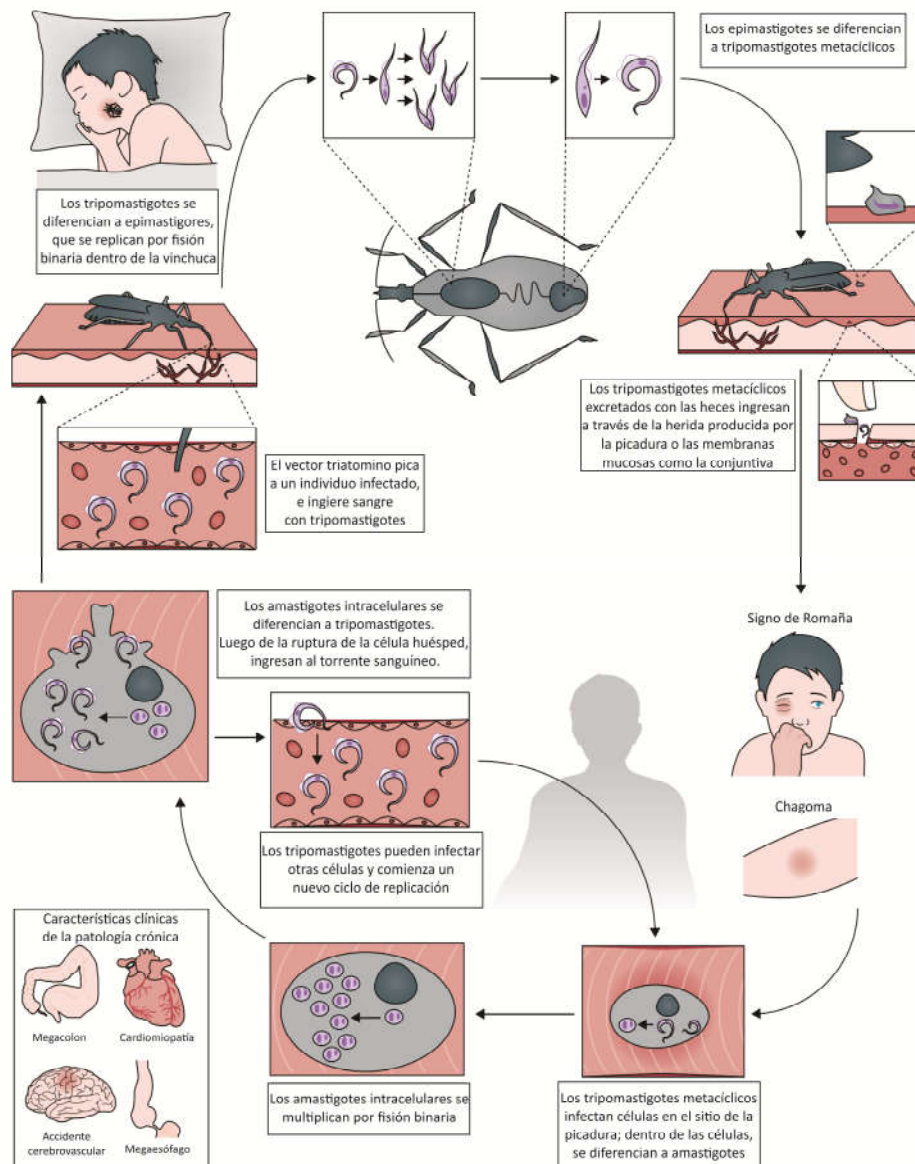


Figura 4. Esquema del ciclo de vida de *Trypanosoma cruzi*. (Adaptado de (Pérez-Molina et al., 2017)

Vías de transmisión

La enfermedad de Chagas es transmitida principalmente a seres humanos y a distintas especies de animales domésticos (perros, gatos, etc) y salvajes (roedores, marsupiales, armadillos, etc) a través de un vector triatmino, dentro de tres ciclos superpuestos: doméstico, peridoméstico y selvático (Cardinal et al., 2008; Gürtler et al., 2015). Si bien han sido determinadas más de 130 especies de triatominos, solo algunas son vectores competentes de *T. cruzi*, y su distribución es variable en todo el continente americano (Gourbiere et al., 2012).

A pesar de que la vía vectorial es la predominante, existen modos alternativos de transmisión de *T. cruzi*:

Vertical o congénita

Si bien existen programas exitosos en el control de la transmisión vectorial, esta se mantiene como un desafío para la eliminación de la enfermedad tanto en países endémicos como no endémicos (Carlier et al., 2015; Soriano-Arandes et al., 2016; Pennington et al., 2017). En un meta-análisis realizado por Howard y colaboradores, la prevalencia de la transmisión congénita mostró una diferencia significativa entre países endémicos y no endémicos, con tasas de transmisión del 5,0% y 2,7%, respectivamente (Howard et al., 2013). Asimismo, recientemente ha sido demostrada la asociación entre polimorfismos en proteínas, que están involucradas en remodelamiento de la matriz extracelular y la respuesta inmune, y la susceptibilidad a la infección congénita con *T. cruzi* (Juiz et al., 2016).

Transfusional o por transplante de órganos

El riesgo de contraer la enfermedad por esta vía representa un 10-20% de los casos y depende de varios factores como la concentración de parásitos en sangre (Angheben et al., 2015) o tejidos (Kransdorf et al., 2014) del donante y la cepa del parásito.

Oral

Se da principalmente a través de jugos de caña o del fruto de açai (*Euterpe oleracea*), un tipo de palmera de Brasil, u otros frutos regionales particularmente en la región de la Amazonia, dando lugar a brotes epidémicos en zonas endémicas. Si bien desde el punto de vista epidemiológico no reviste gravedad, en la última década se ha registrado la mayor cantidad de casos de Chagas agudo transmitido por esta vía, muchos de los cuales culminaron en muerte por miocarditis fulminante (Rueda et al., 2014; Foligheddu et al., 2017).

Accidente laboral

Involucra a personal que, por la índole de su trabajo, tenga contacto con parásitos en cultivos celulares o sangre de personas y/o animales infectados.

Diversidad biológica de *Trypanosoma cruzi*

El agente causal de la enfermedad de Chagas, *T. cruzi*, se caracteriza por una gran variabilidad genética y fenotípica entre sus poblaciones que se manifiesta en todos los estadios de su ciclo de vida. Las manifestaciones clínicas de esta patología son tan diversas, que se ha sugerido que podrían deberse, en parte, a la diversidad biológica que presenta este microorganismo (Miles et al., 1981). La información disponible sugiere que las cepas de parásitos encontradas en los pacientes, más allá de la presentación clínica, refleja la Unidad Discreta de Tipificación (UDT) circulante en los ciclos de transmisión doméstica de una región particular, mientras que en muchos brotes de transmisión oral está implicado el ciclo selvático (Zingales, 2017).

El estudio y caracterización de las formas sanguíneas de *T. cruzi* aisladas de pacientes y animales infectados dio lugar a que se clasificara a este parásito en linajes diferentes (Revollo et al., 1998; Martínez-díaz et al., 2001; Buscaglia et al., 2003). En un trabajo publicado en el año 2000, Brisse y colaboradores infieren la existencia de dos linajes mayores (I y II), y que el linaje II se divide en 5 subgrupos (Brisse et al., 2000). El consenso para la nomenclatura intraespecífica para *T. cruzi* fue propuesto en el 2009 por un comité de expertos, en el cual admitieron un mínimo de 6 linajes genéticos o UDTs, llamados TcI (correspondiente al linaje I) y TcII a TcVI (correspondientes al linaje II) (Zingales et al., 2009), tomando en consideración patrones genéticos, y marcadores bioquímicos y biológicos. El comité además planteó que UDTs adicionales podrían surgir en el futuro. Ese fue el caso de Tcbat. Si bien fue reconocido como el séptimo UDT, los parámetros genéticos y eco-epidemiológicos que deben considerarse para asignar una nueva UDT a un grupo de parásitos no se han definido hasta el momento (Zingales, 2017).

En este trabajo de tesis se utilizaron dos poblaciones de *T. cruzi* de linajes evolutivos completamente diferentes, la cepa RA (TcVI) y un clon (K98) de la cepa CA-I (TcI), que según la Iniciativa Genoma de *Trypanosoma cruzi*, son las únicas aisladas en Argentina (*Trypanosoma cruzi* Genome Initiative, 2000). Las mismas se describen a continuación:

Cepa RA

Fue aislada originalmente de una paciente de 10 años de edad, proveniente de General Pico (La Pampa-Argentina), cursando la fase aguda de la enfermedad de Chagas (González Cappa et al., 1981a). Forma parte del Linaje II, UDT TcVI y tiene predominio de formas delgadas.

Es una cepa altamente virulenta y letal para el ratón cuando se la inocula por vía intraperitoneal con 500 o más parásitos, en una primoinfección. Es pantrópica (Mirkin et al., 1997) y reticulotrópica, capaz de inducir anticuerpos líticos en ensayos *in vitro* de lisis de tripomastigotes (Muller et al., 1986; Celentano et al., 1993)

Cepa CA I, clon K98

Fue aislada originalmente de un paciente con miocardiopatía chagásica crónica (González Cappa et al., 1980), y forma parte del Linaje I, UDT TcI. El clon K98 fue obtenido por la Dra. Celentano a partir de la cepa CA-I (Celentano et al., 1993)

Tanto la cepa CA-I, como su clon K98, son de baja virulencia y no letal para el ratón, independientemente del incóculo. Se comportan de manera miotrópica y los anticuerpos que estimulan carecen de capacidad lítica (Muller et al., 1986; Celentano et al., 1993).

Fases de la enfermedad de Chagas

El curso clínico de la enfermedad usualmente comprende una fase aguda que puede evolucionar a una fase crónica, la cual puede permanecer asintomática por muchos años.

La fase aguda puede durar de 4 a 8 semanas, y los síntomas (si aparecen) pueden incluir fiebre, inflamación en el sitio de inoculación (chagoma de inoculación o signo de Romaña cuando el sitio es la conjuntiva), linfadenopatías y hepatoesplenomegalia. La enfermedad aguda severa ocurre en menos del 5% de los pacientes, e incluye manifestaciones como miocarditis aguda, efusión pericárdica y meningoencefalitis, con un riesgo de mortalidad del 0,2-0,5% (Pinto et al., 2008; Bern et al., 2011). El primer diagnóstico en esta etapa es parasitológico, donde pueden observarse tripomastigotes móviles en preparaciones frescas de sangre, pudiendo ser

los análisis serológicos negativos (Feilij et al., 1983). Las manifestaciones de esta etapa se resuelven espontáneamente en el 90% de las personas infectadas, incluso en personas no tratadas con drogas tripanocidas. La parasitemia decrece sustancialmente a partir de los 90 días luego de la primoinfección, sin embargo, los parásitos no son completamente eliminados, e infectan células de varios tejidos específicos persistiendo indefinidamente durante la vida del hospedador (Rassi et al., 2010). Esto probablemente sea propiciado por mecanismos de evasión del parásito, que reducen la mortalidad del hospedador y mantienen la infectividad de parásito, constituyendo estos pacientes un reservorio importante de la infección (Cardoso et al., 2016). Así, la enfermedad evoluciona hacia una etapa crónica asintomática, con serología positiva pero sin manifestaciones clínicas (Bustamante et al., 2003).

Luego de un período variable de tiempo, 30% de los pacientes puede presentar manifestaciones clínicas diversas comprometiendo diferentes órganos, siendo las de mayor relevancia epidemiológica las formas digestivas y cardíacas.

Tratamiento con benznidazol

Ha transcurrido más de un siglo desde el descubrimiento de la enfermedad de Chagas. Sin embargo, aún no se dispone de una quimioterapia eficiente y segura para su tratamiento. En 1952 se sintetizó por primera vez el Nifurtimox ((RS)-N-(3-metil-1,1-dioxo-1,4-tiazinan-4-il)-1-(5-nitro-2-furil) metanimina) y fue comercializado bajo la marca Lampit® por Bayer. Hace algunos años este dejó de comercializarse en Argentina, y tampoco está disponible en muchos países endémicos. En 1968 se sintetizó el benznidazol (Bzl) (2-nitroimidazol N-bencil-2-(2-nitroimidazol-1-il) acetamida), y fue comercializado bajo la marca Radanil® por Roche hasta el año 2006, momento en que cedió la licencia y los derechos al Laboratorio Farmaceutico do Estado de Pernambuco (Lafepe). En el 2012, y luego de que se viera en riesgo la distribución mundial de Bzl por problemas regulatorios de la empresa, comienza en Argentina el desarrollo de la formulación del comprimido a cargo del Laboratorio Elea y la síntesis para la obtención de la materia prima por el Laboratorio Maprimed. A dichos laboratorios se suman la Fundación Mundo Sano y el Ministerio de Salud de la Nación Argentina. Así, a partir de abril de 2012, comienza la distribución en todo el

territorio Argentino de Bzl bajo la marca Abarax[®], siendo esta la única formulación disponible actualmente para el tratamiento de la enfermedad de Chagas en nuestro país.

Estos compuestos ejercen su actividad biológica parasiticida a través de la formación de radicales libres y/o metabolitos electrolíticos (derivados nitrosos e hidroxilamina) o por inhibición directa de las enzimas involucradas en la detoxificación del parásito (Maya et al., 2010), aunque se han observado casos de resistencia (Mejia et al., 2012; Alsford et al., 2013).

En la actualidad no existen fármacos que superen la acción parasiticida del Nifurtimox o Bzl, aunque este último sigue siendo el de elección dado que presenta menores efectos adversos (Maguire, 2015). En este sentido, la carencia de nuevos fármacos para tratar enfermedades que impactan en los sectores pobres de la sociedad, ha llevado a desarrollar el programa DNDi (Drugs for Neglected Diseases Initiative, Iniciativa de Medicamentos para enfermedades desatendidas). Este es un programa sin fines de lucro, de investigación y desarrollo, orientado por las necesidades de los pacientes, que propone tratamientos seguros, eficaces y asequibles para millones de personas en situación vulnerable que sean afectados por enfermedades desatendidas, en especial la enfermedad de Chagas, las leishmaniasis, la enfermedad del sueño, HIV pediátrico, etc.

Son numerosos los compuestos químicos naturales o sintéticos con potencial actividad tripanocida que están en fase de experimentación con buenos resultados. Entre ellos alopurinol (Grosso et al., 2013; Perez-Mazliah et al., 2013), ketoconazol e itraconazol (Santa-Rita et al., 2005; Assíria Fontes Martins et al., 2015), quinonas (Suto et al., 2015) y antioxidantes (Dhiman et al., 2013). Cabe destacar, que los únicos ensayos clínicos reportados en la base de datos del NIH (NIH Clinical Trials Database, 2017) en los últimos años con nuevas drogas tripanocidas han sido llevados a cabo por DNDi. Sin embargo, de los tres ensayos, dos de ellos que incluían el uso de azoles, como el posaconazol y ravuconazol, no han mostrado diferencias significativas en la reducción de la parasitemia con respecto al Bzl, a pesar de haber tenido buenos resultados preclínicos en modelos animales (Chatelain, 2015). El tercer ensayo en fase II iniciado en el 2014 en Bolivia que involucra el uso de Fexinidazol, debió ser

interrumpido por cuestiones de seguridad y tolerancia. Si bien se ha diseñado un nuevo estudio que se desarrollará en cuatro centros de España con dosis más bajas de la droga, el reclutamiento aún no ha comenzado, por lo que no se tendrán resultados hasta dentro de algunos años (Drugs for Neglected Diseases Initiative, 2017).

Probablemente debido a esto, entre otros factores, es que recientemente la Administración de Alimentos y Fármacos de Estados Unidos (FDA, por sus siglas en inglés) ha aceptado por primera vez una droga tripanocida como el Bzl, para su uso en el territorio estadounidense en pacientes pediátricos de 2 a 12 años de edad (FDA, 2017).

Actualmente, el tratamiento con Bzl está indicado durante la fase aguda y crónica asintomática de la infección, en la que es efectivo en la reducción de la carga parasitaria en los pacientes (Coura, 2009). Durante la etapa crónica, el efecto del Bzl es más controvertido. Bzl contiene un grupo nitro unido a un imidazol, que promueve diversos efectos adversos en los pacientes adultos (Noguerado-Mellado et al., 2016). Entre estos se observan reacciones cutáneas (dermatitis alérgica) (Pérez-Molina et al., 2009), intolerancia digestiva, polineuritis, depresión de medula ósea, hepatitis tóxica (Viotti et al., 2009), neuropatía periférica y angioedema (Miller et al., 2015), que fuerzan al 10% de los pacientes a abandonar el tratamiento. Respecto al tratamiento durante la fase crónica, Hasslocher-Moreno y colaboradores, mostraron que hasta el 26% de los pacientes tratados con Bzl desarrollan reacciones cutáneas, efectos gastrointestinales (10%) y/o neurológicos(5%) (Hasslocher-Moreno et al., 2012).

Ha sido demostrado que el tratamiento etiológico, al reducir la carga parasitaria, dirige al sistema inmune hacia una respuesta inflamatoria balanceada que sería crucial para el control de la infección y de la morbilidad de la enfermedad de Chagas (García et al., 2005; Viotti et al., 2006). Sin embargo, en los últimos años se han llevado a cabo dos ensayos clínicos de relevancia, el BENEFIT (prospectivo, multicéntrico y aleatorizado), y el TRAENA (Aleatorizado, Doble Ciego, Fase III), que fueron diseñados para evaluar la seguridad y eficacia del Bzl en pacientes con cardiomiopatía chagásica. En ambos se obtuvieron resultados similares, encontrando que si bien el tratamiento con Bzl reduce significativamente la detección del parásito, no logra mejorar significativamente el deterioro clínico cardíaco de los pacientes

monitoreados durante 5 años (Morillo et al., 2015; Riarte, 2015; Pays, 2016; Sociedad Argentina de Protozoología, 2016).

A pesar de ser la única droga disponible para el tratamiento de la Enfermedad de Chagas, su mecanismo de acción aún no ha sido dilucidado completamente (Maya et al., 2007). Algunos autores han contribuido al conocimiento de sus efectos inmunomoduladores en diferentes modelos experimentales de sepsis o macrófagos estimulados en cultivo, pero no en un modelo de Chagas experimental. En el hígado de ratones sépticos, Bzl disminuye la expresión de ARNm y proteína de TNF- α y NOS2 por inhibición de NF- κ B y MAPK (p-38 y ERK), proveyendo evidencia de que Bzl es capaz de inhibir específicamente la producción de óxido nítrico (NO) y la liberación de citoquinas en macrófagos RAW 264.7 estimulados con LPS y/o INF γ (Ronco et al., 2011). Además, utilizando el mismo modelo experimental, se determinó que el tratamiento con Bzl inhibe la fosforilación de I κ B α y por lo tanto su degradación, por lo que Bzl se comportaría como un inhibidor específico de amplio espectro de la activación de NF- κ B, independientemente del estímulo ensayado (Manarin et al., 2010). Cabe destacar que estos efectos se observan a altas concentraciones *in vitro* (1mM) o dosis *in vivo* (200mg/kg/día) de Bzl, siendo estas considerablemente superiores a las reportadas en bibliografía como valores de referencia parasiticida.

FISIOPATOLOGÍA CARDIOVASCULAR

El corazón es un órgano formado por dos bombas separadas: el corazón derecho bombea sangre hacia los pulmones y el izquierdo bombea sangre hacia los órganos periféricos. A su vez, cada uno de ellos es una bomba bicameral pulsátil formada por una aurícula y un ventrículo (Figura 5). Cada una de las aurículas es una bomba débil de cebado del ventrículo, que contribuye a transportar sangre hacia el ventrículo correspondiente, que es el que luego aporta la principal fuerza del bombeo que impulsa la sangre (Guyton et al., 2011).

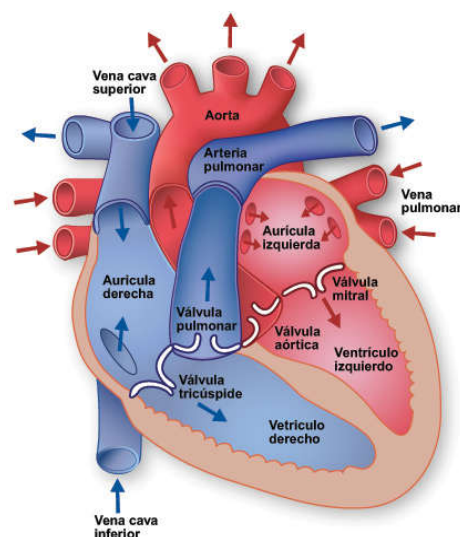


Figura 5. Estructura del corazón y trayecto del flujo sanguíneo a través de las cavidades y válvulas cardíacas

El ciclo cardíaco

Se llama “ciclo cardíaco” al conjunto de fenómenos que tienen lugar desde el comienzo de un latido cardíaco hasta el comienzo del siguiente. Se divide en dos fases: la fase de contracción (sístole) que ocupa un tercio del ciclo cardíaco, y de relajación (diástole), tal como se muestra en la **Figura 6**.

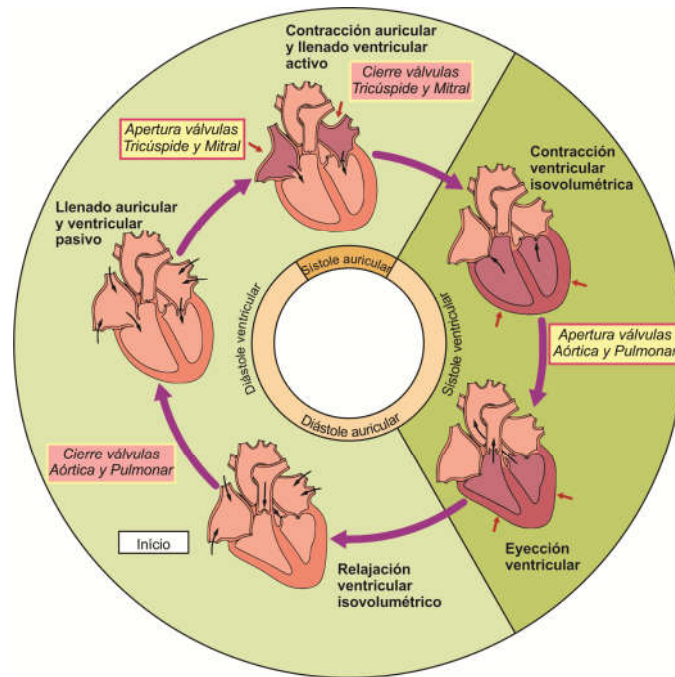


Figura 6. Etapas del ciclo cardíaco

La fase de Sístole comienza con una Contracción Isovolumétrica, en que la presión ventricular es mayor que la auricular. Dado que todas las válvulas se encuentran cerradas, se produce una contracción parcial, sin entrada ni salida de sangre. Le sigue una Fase de Eyección, en que se produce la expulsión de sangre de los ventrículos hacia las arterias. La presión ventricular sigue siendo mayor que la de las arterias, pero las válvulas aórtica y pulmonar se abren y la sangre sale rápidamente por la gran presión hacia los pulmones y órganos periféricos. Por ello, cuando se habla de disfunción sistólica se hace referencia a problemas en la contractilidad ventricular.

Luego de la sístole, en primera instancia se produce la relajación parcial del ventrículo a válvulas cerradas (Relajación Isovolumétrica), haciendo que la presión en la aurícula sea mayor. Le sigue una etapa de Llenado, donde se abren las válvulas mitral y tricúspide y la sangre comienza a pasar desde las aurículas hacia los ventrículos. Al finalizar esta etapa se produce la contracción auricular donde se termina de expulsar la sangre que queda, y el ciclo comienza nuevamente (Boron et al., 2016). La disfunción diastólica hace referencia a problemas en la relajación ventricular, generalmente asociadas a una miocardiopatía hipertrófica o una disfunción sistólica grave.

En la **Figura 7** podemos observar la relación entre la presión y el volumen en el ventrículo izquierdo en cada etapa del ciclo cardíaco.

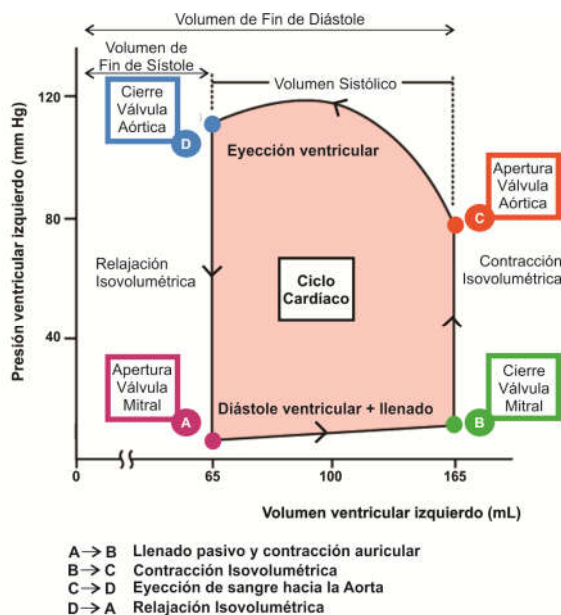


Figura 7. Presión sanguínea en el ventrículo izquierdo en función de su volumen, en cada fase del ciclo cardíaco. (Adaptado de Boron et al., 2016)

Mediante la técnica de Ecocardiografía podemos determinar algunos parámetros que permiten evaluar la función ventricular izquierda. En especial, la ecocardiografía en Modo M permite realizar medidas de las dimensiones del ventrículo (diámetro de fin de sístole y diástole) (Nagueh et al., 2016).

A partir de estos datos se pueden calcular la Fracción de Eyección (FE), que es el porcentaje de volumen que es expulsado durante la sístole, y la Fracción de Acortamiento (FA), que es el porcentaje de cambio en el diámetro de la cavidad ventricular izquierda durante la sístole. Particularmente, la FE es una medida de la Fuerza Ventricular Izquierda, y está relacionada con la contractilidad del miocardio, y aunque es ampliamente utilizada, está condicionada por la cantidad de sangre que llega (pre-carga) y la resistencia vascular (pos-carga). La Fracción de Acortamiento mide el acortamiento sistólico de las fibras circunferenciales del ventrículo izquierdo, y es una medida de la capacidad contráctil del ventrículo izquierdo, independiente de la pre- y pos-carga (Fernández-Pérez et al., 2014). Ambos son marcadores característicos de la función sistólica del ventrículo izquierdo (Lang et al., 2015).

La ecocardiografía se puede complementar con la técnica *Doppler* que permite evaluar los flujos sanguíneos a través de las válvulas, de las cavidades y vasos

cardíacos. Concretamente, nos permite evaluar eventos hemodinámicos como el Tiempo de Relajación Isovolúmica (TRIV), que es un indicador de la función diastólica. Durante la diástole, la válvula mitral se abre y el flujo a su través comienza cuando la presión ventricular cae por debajo de la auricular. Cuando la relajación ventricular se deteriora, la presión ventricular izquierda tarda más en caer por debajo de la presión auricular, retrasándose la apertura mitral y por tanto el inicio del llenado rápido, prolongando el TRIV (Acquatella, 2007).

Cardiopatía chagásica crónica

Diversos factores contribuyen al desarrollo de la cardiomiopatía dilatada chagásica, relacionados al daño tisular debido a la persistencia parasitaria, inflamación, autoinmunidad, fibrosis y cambios microvasculares (Tanowitz et al., 2015). La ruptura de la red capilar debido al infiltrado inflamatorio a base de neutrófilos, linfocitos, macrófagos y eosinófilos ocasionales, induce miocitólisis focal generando injuria microvascular y remodelación cardíaca (Robbins et al., 2006).

Fuertes evidencias han mostrado que el tejido cardíaco, como un blanco importante de la infección con *T. cruzi*, induce la producción de grandes cantidades de citoquinas proinflamatorias, quemoquinas y enzimas, incluyendo la NOS2 y metaloproteasas (MMPs), resultando en inflamación y remodelación cardíaca debido a la infección (Penas et al., 2013, 2015). En respuesta, los fibroblastos proliferan y la matriz de colágeno intersticial se incrementa (Mitelman et al., 2011). Aunque es necesaria para el control de la proliferación de los parásitos, la inflamación, si es exacerbada, resulta perjudicial para el hospedador y en última instancia lleva a la cardiomiopatía dilatada chagásica (Machado et al., 2013). En esta etapa de la enfermedad se observa una dilatación y disminución de la contractilidad del ventrículo izquierdo, evidenciada por el aumento del diámetro de fin de diástole y sístole, y la consecuente disminución de las fracciones de eyección y de acortamiento (Fragata et al., 2015). Además de disfunción sistólica, también puede presentarse con disfunción diastólica, evidenciada por una prolongación del tiempo de relajación isovolúmica (TRIV) (Combellas et al., 1985; Acquatella, 2007). Por otra parte, la presencia de múltiples focos de fibrosis favorece la génesis de arritmias ventriculares (Mitelman et

al., 2011). Además, se pueden desarrollar arritmias auriculares, eventos tromboembólicos e insuficiencia cardíaca congestiva.

Todos estos cambios son de carácter irreversible y conducen a los pacientes a una situación invalidante con alteraciones estructurales y funcionales del miocardio que pueden llevar a la muerte (Figura 8) (Machado et al., 2012).



Figura 8. Esquema de los principales mecanismos patogénicos en la cardiopatía chagásica crónica. (Adaptado de Marin-Neto et al., 2007)

Diversos modelos experimentales han sido propuestos para recrear la cardiopatía observada en el humano. En ese sentido, modelos en perros han mostrado alteraciones electrocardiográficas (Andrade et al., 1987) o disfunción sistólica y diastólica (Santos et al., 2016; Vitt et al., 2016). Similares resultados se observan en monos *Cebus apella* (Falasca et al., 1986). Sin embargo, en el modelo murino, se ha demostrado que solo algunas cepas de ratón infectadas con ciertas cepas de parásitos desarrollan patología cardíaca, y la mayoría de estos estudios informan parámetros histológicos más que cambios eléctricos medidos por electrocardiograma (Eickhoff et al., 2010). Así, si bien en los últimos años se han reportado algunos modelos murinos que evidencian alteraciones eco y electrocardiográficas (Vilar-Pereira et al., 2016a, 2016b; Wen et al., 2017), hasta el momento ninguno involucra cepas de *T. cruzi* aisladas de pacientes de Argentina (*Trypanosoma cruzi* Genome Initiative, 2000).

RESPUESTA PROINFLAMATORIA Y PROFIBRÓTICA EN LA INFECCIÓN CON *T. CRUZI*

Cuando un microorganismo logra pasar la piel y las mucosas, primera barrera de defensa del hospedador, las células y sustancias químicas que forman parte de la inmunidad innata rápidamente responden con el objetivo de impedir la proliferación del mismo. La respuesta celular, en un principio, está a cargo de macrófagos y células dendríticas con la función de presentar antígenos, y tienen la capacidad de reconocer la presencia de patógenos a través receptores de reconocimiento de patrones como los Receptores Tipo Toll (TLRs por su sigla en inglés, Toll-Like Receptors). Los patógenos poseen determinados *patrones moleculares asociados a patógeno* (PMAP) que son reconocidos por diversos TLRs (Kumar et al., 2011). Los tripanosomátidos poseen PMAPs que son reconocidos por diversos TLRs: alquilacilglicerol (TLR2); glicoinositolfosfolípidos y glicosilfosfatidilinositol (TLR2/ TLR4); ADN genómico (TLR9). La señalización por TLRs lleva a la activación de distintas vías proinflamatorias como NF- κ B y MAP kinasas (Moreira et al., 2012; Napetschnig et al., 2013) que producen grandes cantidades de citoquinas (Tarleton, 2007; Basso, 2013) y especies reactivas de oxígeno y nitrógeno (Goncalves et al., 2013). Como consecuencia de la respuesta desencadenada, se produce el reclutamiento de células inflamatorias al tejido infectado, lo que resulta en el infiltrado de células mononucleares.

A continuación del proceso inflamatorio, comienza un período de reparación. Este involucra la proliferación de células epiteliales y vasos sanguíneos. Los fibroblastos proliferan y comienzan a sintetizar colágeno, que deriva en fibrosis y remodelación del tejido afectado (Deb et al., 2014).

Marcadores proinflamatorios

El proceso inflamatorio es complejo y una gran cantidad de mediadores están involucrados en su estimulación y regulación. En mayor medida son producto de células inflamatorias y de los sistemas enzimáticos del plasma, sin embargo, otros tejidos también son capaces de producirlos y liberarlos. Así, estos mediadores pueden tener efectos autócrinos, parácrinos o endócrinos.

Citoquinas

Las citoquinas son polipéptidos producidos por diversos tipos celulares y ejercen sus efectos a través de la interacción con receptores de membrana específicos, induciendo diversas vías de señalización intracelular como NF- κ B y ERK/MAPK. Dado que son las encargadas de mediar entre la inducción y la modulación de la respuesta inflamatoria, su producción y liberación se encuentra auto-limitada, y aunque en general poseen una vida media corta, algunas pueden persistir en circulación por largos períodos de tiempo (Abbas et al., 2006).

Los efectos de las citoquinas son altamente pleiotrópicos, ya que según el tejido en el que se libera y el contexto molecular, pueden derivar en respuestas diferentes e incluso antagonistas (Trevani et al., 2009). Su respuesta es altamente redundante, ya que diferentes citoquinas pueden ejercer efectos similares. Tal es el caso de las Interleuquinas (IL), como IL-1 β o IL-6, y el Factor de Necrosis Tumoral α (TNF- α), que participan en la inducción de la respuesta inflamatoria aguda, local y sistémica. Con el fin último de eliminar el agente causal del proceso infeccioso, estas actúan sobre diferentes poblaciones celulares cercanas al foco inflamatorio, que pueden derivar en el reclutamiento de leucocitos al sitio de infección y su proliferación (Abbas et al., 2006). Si bien ha sido ampliamente demostrado que un aumento de IL-6 está asociado a las formas más severas de la enfermedad de Chagas (Dutra et al., 2014; Keating et al., 2015), en los últimos años se ha reportado que existe un rol dual de esta citoquina, dado que la misma es capaz de promover la polarización de los macrófagos hacia un perfil M2, del tipo reparador, en ratones infectados con *T. cruzi* (Sanmarco et al., 2017).

En particular TNF- α es una de las citoquinas más estudiadas en la fisiopatología cardíaca, dado que posee efectos directos sobre la contractilidad de los cardiomiocitos y se ha demostrado que altera la homeostasis del calcio (Kumar et al., 2007). Entre los efectos negativos de TNF- α se encuentran el colapso circulatorio y el daño de órganos sólidos. Debido a sus propiedades procoagulantes, que favorecen fenómenos trombóticos en la microcirculación, puede llevar a la necrosis celular y a un aumento de la permeabilidad vascular (Abbas et al., 2006).

IL-6 también es producida en el miocardio y posee propiedades fisiológicas similares a las de TNF- α pero con menor capacidad para producir shock. Esta citoquina está vinculada a fenómenos hematológicos y metabólicos agudos que se asocian con la sepsis (Gao et al., 2015).

Las tres citoquinas descritas pueden contribuir al desarrollo y progresión de la insuficiencia cardíaca, ya que promueven la hipertrofia de cardiomiocitos, activan las MMPs, provocan la disfunción contráctil e inducen apoptosis (Engel et al., 2004; Gwechenberger et al., 2004; Haudek et al., 2007; Van Tassell et al., 2013; Li et al., 2018)

Especies reactivas: Óxido nítrico

Durante la inflamación también se produce una variedad de mediadores con potencial citotóxico, como los derivados del óxido nítrico (NO^\cdot), denominados Especies Reactivas del Nitrógeno (ERN). El NO^\cdot es un radical libre gaseoso que tiene una vida media corta, entre 6 y 10 segundos, y un alto potencial de difusión. Puede actuar solo como agente oxidante, interactuar con el O_2^- para formar un peroxinitrito inestable (ONOO^-) o ser transformado en nitrosotioles. Todas estas especies tienen una potente actividad microbicida.

Además, el NO^\cdot ingresa al citosol de células adyacentes al sitio de su síntesis y activa cascadas de señalización que dan lugar a la relajación del músculo liso y la consecuente vasodilatación (Ignarro, 2002). Bajo estas condiciones fisiológicas, el NO^\cdot (en rangos de concentración pM o nM) también actúa como segundo mensajero en el sistema nervioso central, inhibe la adhesión y agregación plaquetaria y confiere citoprotección. Sin embargo, a altas concentraciones (en el orden de μM) el NO^\cdot puede generar otras especies reactivas de oxígeno y nitrógeno, cuyos efectos pueden ser deletéreos para las células debido a su alta capacidad oxidativa.

La biosíntesis de NO^\cdot en el organismo es llevada a cabo por las enzimas óxido nítrico sintasas (NOS) a partir de L-arginina y oxígeno molecular. Consiste en una reacción de oxidación que consume cinco electrones para generar NO^\cdot y L-citrulina a través de la formación de un intermediario NW-hidroxi-L-arginina (Alderton et al., 2001) (Figura 9).

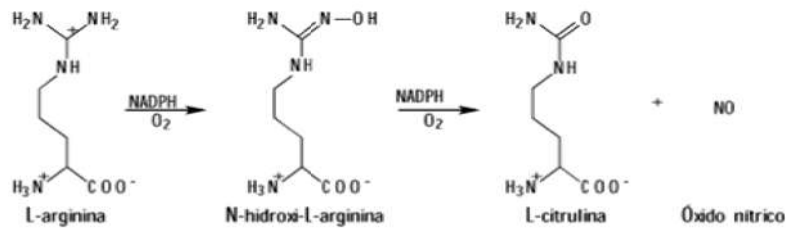


Figura 9. Formación del Óxido Nítrico

Existen tres isoformas de NO sintasas (NOS), la NOS neuronal (nNOS o NOS1), la NOS inducible (iNOS o NOS2), y la NOS endotelial (eNOS o NOS3). La NOS1 y NOS3 responden a cambios en los niveles de Calcio/Calmodulina y producen NO[•] a niveles basales relativamente bajos. Sin embargo, la NOS2, es insensible a Calcio/Calmodulina, está regulada a nivel transcripcional y es expresada en hepatocitos, células endoteliales, células mastoideas, células musculares lisas, monocitos, macrófagos y cardiomiocitos (Alderton et al., 2001). Así, produce altas cantidades de NO[•] en respuesta a citoquinas proinflamatorias u otros estímulos como PMAPs que activan la vía NF-κB (Pautz et al., 2010).

Marcadores profibróticos

El corazón contiene una red de colágeno como andamiaje de sostén que contribuye a la contractilidad y fuerza del corazón. En las enfermedades cardíacas frecuentemente se encuentran intensos depósitos de colágeno que derivan en fibrosis. Existen dos tipos de fibrosis, la de remplazo y la reactiva. La primera ocurre cuando las células cardíacas muertas son reemplazadas por colágeno, y se la denomina fibrosis reparadora. Sin embargo, la fibrosis puede ocurrir sin pérdida celular, por ejemplo debido a un aumento de la carga mecánica del corazón. En este caso, se observan parches de fibrosis en el miocardio o fibras largas de colágeno entre los cardiomiocitos (fibrosis intersticial), y es llamada fibrosis reactiva. Ambos tipos de fibrosis pueden causar disfunción sistólica y diastólica (Janicki et al., 2002), y en especial la fibrosis reactiva puede llevar a un incremento en la susceptibilidad a padecer arritmias cardíacas (de Jong et al., 2011).

Si bien son invasivas y requieren una biopsia cardíaca, las técnicas histológicas (tinción con rojo picosirio) y bioquímicas (expresión de marcadores profibróticos),

siguen siendo las más efectivas para evidenciar estos depósitos, frente a las técnicas no invasivas (de Jong et al., 2012).

El Factor de Crecimiento Transformante β (TGF- β) es una citoquina que juega un rol complejo en la inflamación. Es sabido que tiene un papel como supresor de citoquinas, modulador de la inflamación (Chen et al., 1994), y en la diferenciación de células Treg FOXP3⁺ (Chen et al., 2003; Dardalhon et al., 2008). Sin embargo, se ha demostrado que TGF- β tiene un rol en la diferenciación de células Th17, revelando un efecto proinflamatorio (Veldhoen et al., 2006). Además, ha sido reportado que TGF- β puede ser inducido por citoquinas proinflamatorias, y es un importante promotor de fibrosis, contribuyendo a la reparación del tejido (Biernacka et al., 2011) y la diferenciación celular a miofibroblastos (Araújo-jorge et al., 2012). Asimismo, TGF- β promueve la expresión del factor de crecimiento de tejido conectivo (CTGF) y modula el fenotipo de los cardiomiocitos disparando efectos hipertróficos (Dobaczewski et al., 2011).

La enfermedad de Chagas como una patología inflamatoria

La infección por *T. cruzi* induce complejos procesos inflamatorios a nivel tisular, para garantizar el control del crecimiento del parásito. Sin embargo, los desequilibrios inmunológicos desencadenados pueden conducir a lesiones, tanto en el tejido cardíaco como a nivel sistémico (Gutierrez et al., 2009).

Durante la fase aguda de la enfermedad, los tripomastigotes de *T. cruzi* infectan a una variedad de tipos celulares, incluyendo cardiomiocitos y macrófagos. La fase aguda generalmente se resuelve espontáneamente después de 4 a 8 semanas, y los pacientes ingresan en una fase crónica asintomática en la que presentan serología positiva para *T. cruzi*, ausencia de signos y síntomas de compromiso cardíaco o digestivo, radiografía de tórax y electrocardiograma normal (Dias, 1989). Existen evidencias de que este proceso es propiciado por el desarrollo de una respuesta inmunomoduladora, y aunque las bases moleculares aún no han sido del todo establecidas, se observa escasa producción de citoquinas proinflamatorias y aumento en la liberación de citoquinas antiinflamatorias, como IL-13, IL-5 e IL-10 (Poveda et al., 2014). A su vez se observa presencia de células T regulatorias y de macrófagos con

activación alternativa que fomentan y promueven el mantenimiento de la fase crónica asintomática (Vitelli-Avelar et al., 2005; Rodrigues et al., 2012).

Ha sido demostrado que la fase crónica asintomática de la enfermedad está asociada con el predominio de un ambiente antiinflamatorio, mientras que la forma cardíaca está asociada al predominio de un ambiente inflamatorio (Dutra et al., 2014). El 30% de los pacientes que ingresan en etapa crónica desarrollarán alteraciones cardíacas o digestivas, pudiendo los primeros derivar en miocardiopatía chagásica crónica. Esta se caracteriza por presentar un intenso infiltrado inflamatorio en el tejido miocárdico, especialmente en los sitios donde hay nidos de amastigotes y/o antígenos de *T. cruzi*. Este infiltrado celular está compuesto principalmente por monocitos, neutrófilos y linfocitos T CD4⁺ y CD8⁺, con altos niveles de expresión de citoquinas proinflamatorias como IL-6, TNF- α e IFN- γ (Dutra et al., 2014; Poveda et al., 2014), que pueden estar involucrados en la inducción de TGF- β . En el miocardio de los pacientes con enfermedad de Chagas crónica, se observan altos niveles de TGF- β y otros factores de crecimiento que median la fibrosis (Reis et al., 2000; Cutrullis et al., 2011).

En síntesis, una respuesta inflamatoria exacerbada y sostenida en el tiempo, puede derivar en fibrosis y remodelación cardíaca, la cual puede ser causal de la pérdida progresiva de la capacidad contráctil del corazón (Mitelman et al., 2011)(Figura 10).

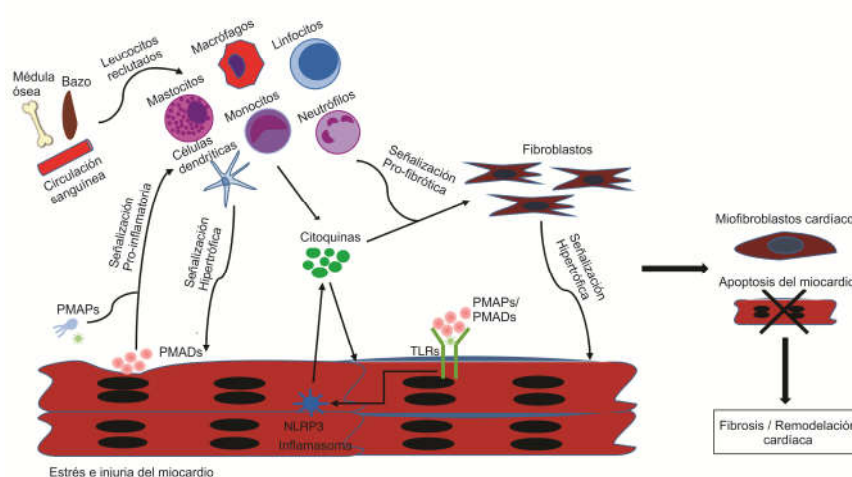


Figura 10. Regulación de la inflamación en la remodelación cardíaca. PMAPs= Patrones Moleculares Asociados a Patógenos. PMADs= Patrones Moleculares Asociados a Daño. TLRs= Receptores Tipo Toll. (Adaptado de Zhang et al., 2017).

RESOLUCIÓN DE LA INFLAMACIÓN

Receptores Activados Por Factores De Proliferación Peroxisomal (PPAR)

Los Receptores Activados por Factores de Proliferación Peroxisomal (PPARs) son factores de transcripción activados por ligando, que pertenecen a la súperfamilia de receptores de hormonas esteroideas tipo I. Esta familia incluye tres isoformas denominadas PPAR α , PPAR β/δ y PPAR γ , las cuales son codificadas por distintos genes ubicados en distintos cromosomas, con alto grado de conservación de la secuencia interespecie (Michalik et al., 2006).

Todos los PPARs actúan mediante la formación de heterodímeros con el receptor nuclear de ácido retinóico (RXR), seguido de la unión a elementos de respuesta específicos en genes blanco llamados Elementos de Respuesta a PPAR (PPREs). Estos elementos se caracterizan por una secuencia común que consiste en una repetición de la secuencia consenso AGGTCA, separada por un nucleótido (Ijpenberg et al., 1997). La activación de la transcripción vía PPARs depende de diferentes pasos que incluyen la unión del ligando al receptor, la unión de PPAR al gen blanco, la remoción de co-represores, el reclutamiento de co-activadores y el remodelamiento de la estructura de la cromatina (Xu et al., 2002) (Figura 11).

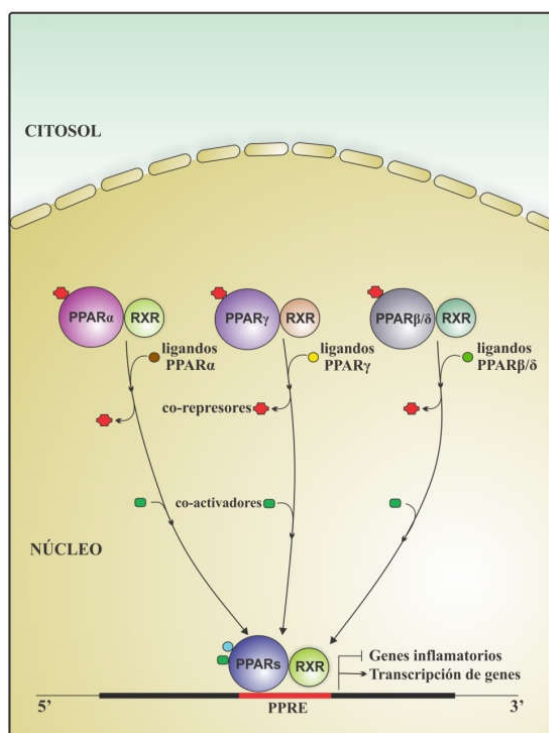


Figura 11. Mecanismo de activación de PPAR dependiente de ligando. (Adaptado de Hovsepian - Penas et al., 2012)

Particularmente, la isoforma PPAR α se expresa de manera ubicua, aunque en humanos su expresión relativa es mayor en intestino delgado y corazón (Rakhshandehroo et al., 2010), y se ha reportado una alta expresión en células mononucleares de sangre periférica (Marx et al., 2001, 2002). Los ligandos endógenos de PPAR α son en general lípidos, incluyendo ácidos grasos y derivados del ácido araquidónico. Los ligandos sintéticos de PPAR α son derivados del ácido fíbrico, dentro de los cuales el fenofibrato (Fen) es el más estudiado (Guay, 2002). Estos no solo tienen efectos en la disminución de los triglicéridos, sino que también aumentan los niveles de colesterol-HDL debido al aumento de la expresión de apolipoproteínas (Apo) ApoAI y II.

Si bien es claro el rol de los receptores PPAR en el metabolismo energético, también están involucrados en otros procesos biológicos importantes tales como crecimiento, desarrollo, apoptosis y resolución de la inflamación en una amplia variedad de tejidos (Pazienza et al., 2012) y ha sido demostrado que existe una fuerte relación entre la modulación de la homeostasis de nutrientes y la función inmune (Bookout et al., 2006; Harmon et al., 2011).

Fenofibrato: Ligando sintético de PPAR α

El Fen (propan-2-il 2-[4-(4-clorobenzoil)fenoxi]-2-metilpropanoato) es un derivado sintético del ácido fenoxi-isobutírico de tercera generación (NCI Thesaurus. NIH, 2017) y actualmente es utilizado en la clínica médica como agente hipolipemiente para disminuir el riesgo de aterosclerosis (Ling et al., 2013).

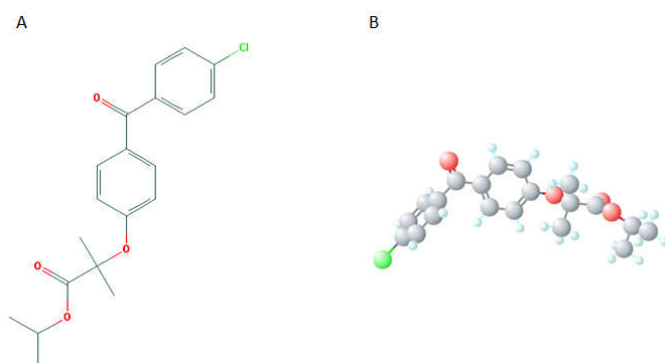


Figura 12. Fenofibrato, estructura 2D (A) y conformación 3D (B). (Adaptado de National Center for Biotechnology Information. PubChem Compound Database, 2017).

PPAR α y la modulación de la respuesta inflamatoria y fibrosis

A pesar de que regula numerosas vías metabólicas, PPAR α también tiene un rol muy importante en la modulación de procesos inflamatorios, principalmente inhibiendo la expresión de genes vía mecanismos de transrepresión y en la inhibición de la fibrosis tisular. En modelos que utilizan ratones knock-out para PPAR α , se observó una respuesta inflamatoria prolongada (Devchand et al., 1996), y la aparición temprana de fibrosis cardíaca (Watanabe et al., 2000). Ha sido ampliamente descrito que el efecto antiinflamatorio de PPAR α está relacionado con su interferencia con la actividad de varios factores de transcripción proinflamatorios como el Transductor de Señal Y Activador de La Transcripción (STAT), la Proteína Activadora-1 (AP-1) y el Factor Nuclear- κ B (NF- κ B) (Delerive et al., 1999, 2002; Jen et al., 2016).

NF- κ B pertenece a la familia de proteínas NF- κ B/Rel que se unen al ADN en una variedad de formas diméricas, como homo o heterodímeros, y su activación puede ser canónica o no canónica (**Figura 13**). En la vía canónica de señalización, cuando un estímulo (generalmente proinflamatorio) desencadena la activación del complejo IKK, se produce la fosforilación, ubiquitinación y degradación de las proteínas inhibitoras I κ B. El dímero NF- κ B (p65-p50) liberado, es activado luego de varias modificaciones postraduccionales, y es traslocado al núcleo donde se une a secuencias específicas de ADN y promueve la transcripción de genes blanco (Hayden et al., 2008). Entre estos se encuentran citoquinas, quimioquinas, moléculas de adhesión vascular y celular y enzimas proinflamatorias como NOS2, Ciclooxygenasa 2 (COX2), MMP-2 y MMP-9, entre otros (van Delft et al., 2015).

A diferencia de la activación rápida y transitoria de la vía canónica, la activación de la vía no canónica de NF- κ B es lenta y persistente. En general es activada por algunos miembros de la superfamilia de receptores de TNF-R, como CD40, RANK, o LT β 4. En esta vía está involucrada la fosforilación y procesamiento de p100, y es dependiente de NIK e IKK α pero no del complejo trimérico IKK (Sun, 2017).

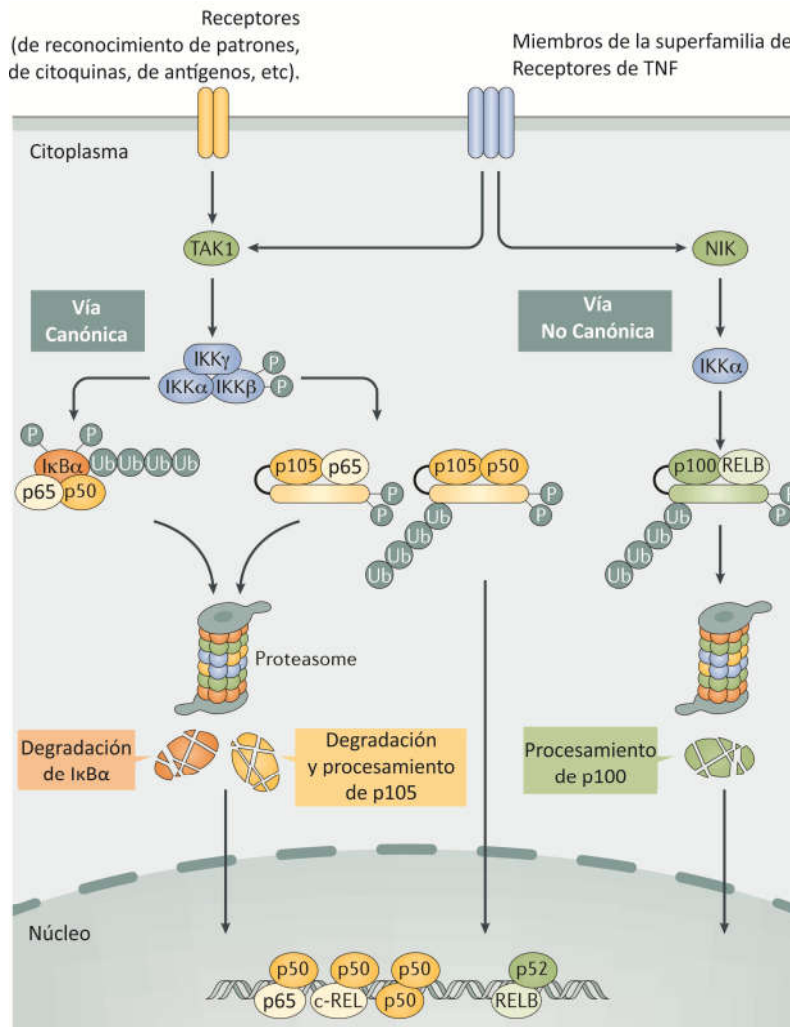


Figura 13. Vía canónica (izquierda) y no canónica (derecha) de señalización por NF-κB. (Adaptado de Sun, 2017)

La activación de NF-κB ha sido correlacionada con numerosas enfermedades cardiovasculares incluyendo la isquemia miocárdica y la falla e hipertrofia cardíaca (Panday et al., 2016), por lo que resulta de vital importancia poder modular su activación.

En ese sentido, se ha identificado que la región promotora del inhibidor de NF-κB, IκBα, contiene elementos de respuesta a PPAR (PPRE), y efectivamente PPARα puede unirse a los mismos, favoreciendo su expresión (Zhang et al., 2014). Además, PPARα es capaz de interferir con la capacidad de transactivación de NF-κB y AP-1, interactuando de manera directa con p65 (Delerive et al., 1999). Ambos eventos impiden la activación de NF-κB.

La eficacia de los agonistas de PPAR, incluido el Fen, como reguladores de la inflamación y de la remodelación de la matriz extracelular del corazón ha sido

reportada extensamente (Lockyer et al., 2010). Por ejemplo, Fen es capaz de prevenir la inflamación cardíaca y la fibrosis en ratones diabéticos (Zhang et al., 2016). Además, ha mostrado ejercer efectos cardioprotectores frente a varios desordenes cardíacos, entre ellos en modelos *in vivo* de hipertrofia cardíaca producida por sobrecarga de presión (Zou et al., 2013) o de miocarditis experimental en ratas (Cheng et al., 2016), y en pacientes con disfunción sistólica (Yin et al., 2013). Debido a su capacidad de prevenir, en diferentes modelos experimentales, fibrosis intersticial y perivascular en riñón, hígado, pulmón y corazón, el Fen ha sido propuesto recientemente como un potencial agente antifibrótico (McVicker et al., 2017).

En trabajos previos del grupo hemos demostrado que ligandos PPAR γ y PPAR α reducen la reacción inflamatoria, en modelos *in vivo* e *in vitro* de infección con *T. cruzi* (Penas et al., 2013, 2015) y de cardiomiocitos estimulados con LPS (Hovsepian et al., 2010) o infectados con *T. cruzi* (Hovsepian et al., 2011). Sin embargo, aún quedan muchos interrogantes respecto del rol de los ligandos PPAR α en la enfermedad de Chagas.

OBJETIVOS

*“Quiero a los que con su ciencia y su razón
vencen a diario el dolor y el sufrimiento”*

Silo. 1989

1. Evaluar la eficacia parasiticida de bajas dosis de benznidazol, en un modelo murino de infección con una cepa de alta virulencia de *Trypanosoma cruzi*.

- 1.1. Estudiar la eficacia parasiticida de bajas dosis de benznidazol
- 1.2. Evaluar los efectos de bajas dosis de benznidazol sobre la respuesta inflamatoria cardíaca y sobre marcadores de injuria tisular como la Creatina Kinasa
- 1.3. Estudiar las propiedades antiinflamatorias de bajas dosis de Bzl en un modelo *in vitro* de células cardíacas murinas
- 1.4. Evaluar el papel de la vía NF- κ B en los efectos antiinflamatorios de Bzl, en cardiomiocitos estimulados con LPS

2. Evaluar el efecto del tratamiento conjunto de benznidazol y fenofibrato en la disfunción ventricular e inflamación cardíaca en un modelo murino de infección mixta con *Trypanosoma cruzi*.

- 2.1. Caracterizar la disfunción ventricular en el modelo de infección
- 2.2. Evaluar el efecto del tratamiento conjunto sobre la disfunción ventricular y el parasitismo tisular
- 2.3. Evaluar el efecto del tratamiento conjunto sobre la respuesta inflamatoria cardíaca en ratones infectados con *Trypanosoma cruzi*
- 2.4. Evaluar el efecto del tratamiento conjunto sobre la fibrosis cardíaca y la remodelación cardíaca en ratones infectados con *Trypanosoma cruzi*
- 2.5. Identificar la participación de la vía NF- κ B en los efectos ejercidos por fenofibrato, en cardiomiocitos infectados con *Trypanosoma cruzi*

MATERIALES Y MÉTODOS

*“Soy de las que piensan que la ciencia tiene una gran belleza.
Un científico en su laboratorio no es sólo un técnico:
es también un niño colocado ante fenómenos naturales
que le impresionan como un cuento de hadas”*

Marie Curie

REACTIVOS

En la Tabla 1 se muestran todos los reactivos utilizados para la realización de este trabajo de tesis.

Reactivo	Utilizado para:	Marca / Empresa
Benznidazol (Abarax®) Nº Identificación PubChem CID=31593	Tratamientos <i>in vitro</i> e <i>in vivo</i>	ELEA
Fenofibrato (Daunlip®) Nº Identificación PubChem CID=3339		Montpellier
DMEM (Dulbecco's Modified Eagle Medium)	Cultivo primario de células cardíacas	Gibco™/Life Technologies
Medium 199		Gibco™/Life Technologies
HEPES		Promega/Biodynamics
Suero Fetal Bovino		Internegocios
PenStrep®		BioReagent/Sigma- Aldrich Co
LPS Escherichia coli (O26:B6)	Estimulación de células cardíacas	Sigma-Aldrich Co
MK886 (Antagonista PPARα)	Tratamiento de células cardíacas	Sigma-Aldrich Co
Anticuerpos primarios (anti-IkBα, anti-NOS2, anti-p65, anti-MMP-9)	Western blot	Santa Cruz Biotechnology Inc
Anticuerpo primario anti-α actina y anticuerpos secundarios conjugados con HRP o FITC	Western blot/ Inmunocitoquímica	Sigma-Aldrich Co
Kit ELISA (IL-6, TNF-α)	ELISA	BD Biosciences
ABTS (2,2-Azino-bis(3Ethylbenzthiazoline -6-Sulfonic Acid).	ELISA	Roche®/Sigma-Aldrich Co
CK-NAC UV Unitest.	Determinación de actividad sérica de Creatina Kinasa	Wiener lab
Sulfanilamida y Naftietilendiamina	Ensayo de Griess	Sigma-Aldrich Co
Acrilamida, poliacrilamida	Western blot	Bio-Rad
SDS, Persulfato de Amonio	Western blot	Promega/Biodynamics
Membrana PVDF Immobilon-P	Western blot	Millipore™ (Biopore)
Sustrato de ECL	Western blot	Sigma-Aldrich Co
Combinación de Inhibidores de Proteasas	Extracción de proteínas	Sigma-Aldrich Co
Nonidet P-40	Extracción de proteínas	Roche Applied Science
Reactivo de Bradford	Extracción de proteínas	Bio-Rad Protein Assay
Albúmina Sérica Bovina (BSA)	Extracción de proteínas	Sigma-Aldrich Co
Quick Zol®	Extracción ARN	Kalium/Embiotec
Transcriptasa Reversa M-MLV	Extracción ARN	Promega/Biodynamics
Inhibidor de ribonucleasas (RNase OUT)	Extracción ARN	Life Technologies
RQ1 DNAsa	Extracción ARN	Promega/Biodynamics
5x HOT FIREPol Eva Green qPCR Mix Plus (ROX)	qPCR y RT-qPCR	Bioscientifica
Cebadores	qPCR y RT-qPCR	Life Technologies

Tabla 1. Reactivos

RATONES Y PARÁSITOS

La línea de ratones BALB/c fue mantenida en el bioterio del Instituto de Investigaciones en Microbiología y Parasitología Médica (IMPaM, UBA-CONICET), sito en el Departamento de Microbiología, Inmunología y Parasitología de la Facultad de Medicina de la UBA.

Las poblaciones parasitarias utilizadas en este trabajo de tesis, RA y K98 (CA-I), pertenecen a diferentes linajes evolutivos y fueron descritas en detalle en la sección “Diversidad biológica de *Trypanosoma cruzi*” (Pág. 8). Las poblaciones de *T. cruzi* fueron suministradas por el mismo departamento y en él se llevaron a cabo las infecciones.

Todos los procedimientos que involucraron animales fueron realizados siguiendo las normas establecidas por el CICUAL (Comité Institucional para el Cuidado y Uso de Animales de Laboratorio, Facultad de Medicina, UBA). A su vez, estos procedimientos fueron aprobados por el comité de ética del CONICET mediante la utilización de guías de la ANMAT y SENASA basadas en la guía de uso y cuidado de animales de laboratorio del Instituto de Salud de los Estados Unidos (NIH, USA).

MODELOS *IN VIVO* DE INFECCIÓN CON *TRYPANOSOMA CRUZI*

Modelo de infección letal con una cepa altamente virulenta de *T. cruzi*

Ratones BALB/c de 8 semanas de edad (7 por grupo), se infectaron vía intraperitoneal con 500 tripomastigotes sanguíneos de la población de alta virulencia RA (pantrópica/reticulotrópica) de *T. cruzi* (UDT VI). El tratamiento comenzó tan pronto como se detectó parasitemia por microhematocrito. El Bzl se resuspendió en aceite de maíz, y se administró oralmente a 10, 25 y 100 mg/Kg/día, por 30 días consecutivos. Los ratones infectados se dividieron en grupos que recibieron los siguientes tratamientos: Grupo 1=Aceite de maíz, Grupo 2= Bzl 10 mg/Kg/día, Grupo 3= Bzl 25 mg/Kg/día, Grupo 4= Bzl 100 mg/Kg/día. El Grupo 5 corresponde a ratones no infectados, no tratados. Por razones humanitarias, los ratones infectados o infectados y tratados con la dosis más baja de Bzl (Grupos 1 y 2) fueron sacrificados a los 15 d.p.i,

ya que, basándonos en ensayos preliminares, no sobreviven más allá de ese día. Los ratones de los grupos 3 a 5 fueron sacrificados a los 55 d.p.i.

Modelo de infección no letal con el clon K98 de *T. cruzi*

Ratones BALB/c de ocho semanas de edad (7 por grupo), fueron infectados vía intraperitoneal con 1×10^5 tripomastigotes sanguíneos del clon de baja virulencia K98 (población CA-I) de *T. cruzi* (UDT I). Se realizaron estudios ecocardiográficos a las 6, 12, 14, 16, 18 y 20 semanas p.i. (Figura 14).

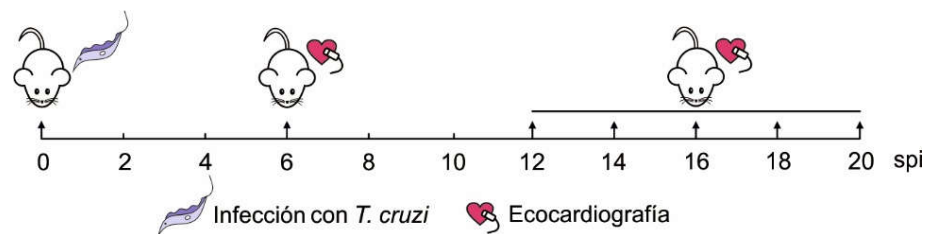


Figura 14. Esquema de infección no letal con el clon K98 (CA-I) de *Trypanosoma cruzi*. spi= semanas post infección.

Modelo de infección no letal con la población RA de *T. cruzi*

Ratones BALB/c de ocho semanas de edad, fueron infectados vía intraperitoneal con 50, 100, 200 o por vía intradermoplantar con 50 o 100 tripomastigotes sanguíneos de la cepa de alta virulencia RA (pantrópica/reticulotrópica) de *T. cruzi* (UDT VI). Se realizaron estudios ecocardiográficos a las 4 y 20 semanas p.i (Figura 15).

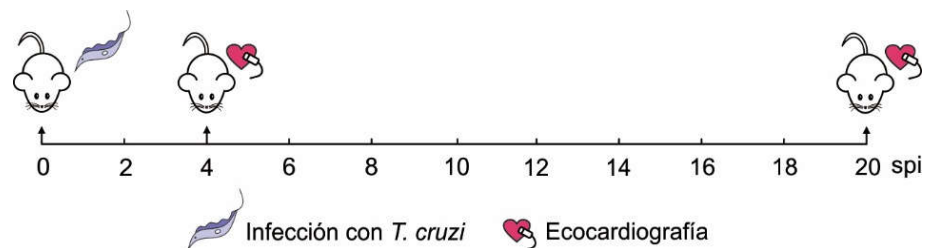


Figura 15. Esquema de infección no letal con la cepa RA de *Trypanosoma cruzi*. spi= semanas post infección.

Modelo de infección mixta con dos cepas de *T. cruzi*

En nuestro laboratorio hemos desarrollado un modelo experimental que reproduce algunas características de la infección crónica de esta patología. Ratones BALB/c de 8 semanas de edad (7 por grupo) fueron inoculados con 1×10^5 tripomastigotes del clon de baja virulencia K98 por vía intraperitoneal. A los 42 d.p.i., que coincide con el pico/meseta de parasitemia para esta cepa, los ratones se re-infectaron con 100 (1×10^2) tripomastigotes de la cepa de alta virulencia RA por vía intraperitoneal. Este modelo nos brinda la posibilidad de estudiar esta patología en la etapa crónica sintomática, con el fin de poder evaluar el efecto de la terapia conjunta de bajas dosis de Bzl y ligandos PPAR α sobre diferentes parámetros cardíacos.

El tratamiento comenzó tan pronto se evidenció disfunción ventricular evaluada por ecocardiografía, a las 10 semanas post-infección. Se administraron por vía oral 25 mg/Kg/día de Bzl por 15 días consecutivos y paralelamente 100 mg/Kg/día de Fen disuelto en aceite de maiz durante 30 días consecutivos. Al finalizar el tratamiento se realizaron nuevamente estudios ecocardiográficos. La **Figura 16** muestra un esquema de las infecciones y tratamientos.

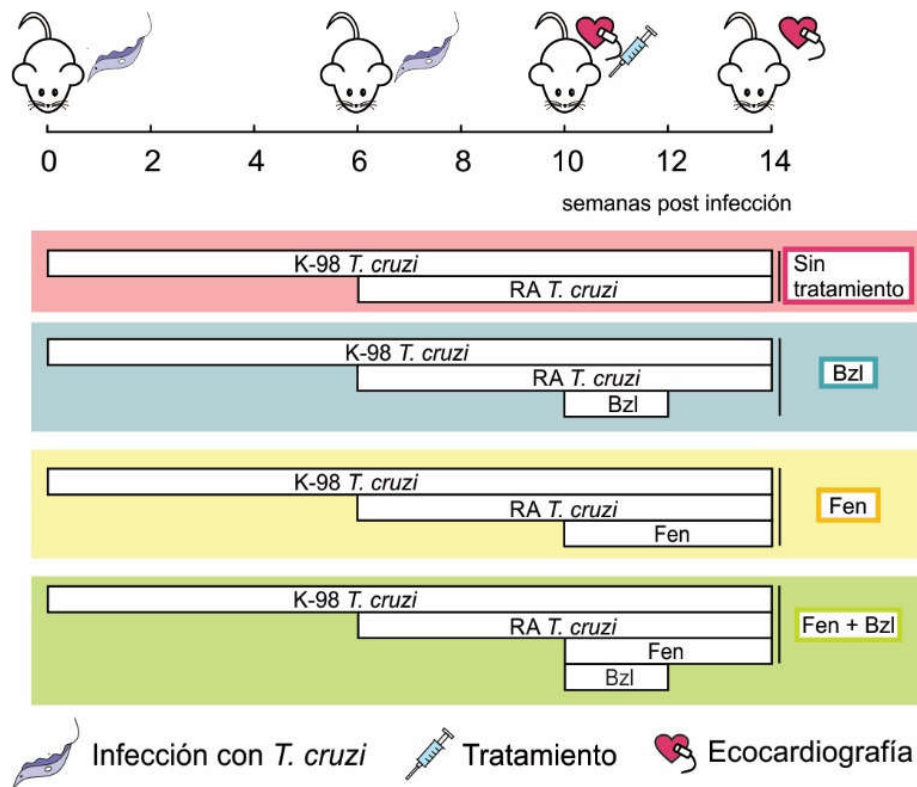


Figura 16. Esquema de infección mixta con K98 y RA de *T. cruzi* y tratamientos.

MODELOS IN VITRO

Cultivo primario de células cardíacas a partir de ratones neonatos

Ratones CF-1 neonatos de 1 a 3 días de vida fueron sacrificados y los corazones se removieron asépticamente. Los mismos fueron mantenidos en solución salina de Hanks estéril (HBSS 1) en hielo. Luego de tres lavados sucesivos con HBSS 1, los tejidos fueron disgregados mecánicamente en fragmentos más pequeños. Las células fueron aisladas tras sucesivas digestiones con tripsina de páncreas porcino (0,25% peso/vol en HBSS 1) a 37° C con agitación a 200 rpm. Las células liberadas tras el primer lavado fueron descartadas, y las obtenidas de las digestiones subsiguientes fueron mantenidas en igual volumen de HBSS 2 hasta el aislamiento de la mayor cantidad posible de células, tal como fue previamente descrito (Hovsepian et al., 2010). Una vez aisladas, las células fueron centrifugadas por 8 min a 200 x g y resuspendidas en medio de cultivo DMEM: M-199 (relación 4:1, vol/vol), suplementado con 10% Suero Fetal Bovino (SFB) y antibióticos (PenStrep® 10ml/L). Luego, fueron colocadas en botellas de cultivo e incubadas durante 2 h a 37°C en atmósfera humidificada con 5% de CO₂, que permite la adhesión de poblaciones no miocíticas (en particular fibroblastos) y el enriquecimiento de la población no adherente miocardiocítica. Las células en suspensión fueron recolectadas y cultivadas a una densidad de 1x10⁵ células por cm² en placas de 6 pocillos con medio de cultivo DMEM: M-199, 10%SFB y antibióticos, hasta alcanzar un 80% de confluencia.

Obtención de tripomastigotes sanguíneos de *T. cruzi* para infección *in vitro*

Ratones de la cepa exocriada CF-1 de 21 días de vida fueron infectados por vía intraperitoneal con 2x10⁵ tripomastigotes de la cepa RA de *T. cruzi*. Se procedió a realizar la eutanasia de los ratones a los 13 d.p.i, que corresponde al pico de parasitemia. Inmediatamente, se obtuvo sangre por punción intracardíaca empleando 5 unidades de heparina/ml. La sangre fue diluida 1:5 en medio de cultivo DMEM, centrifugada a 400 x g durante 30 min a temperatura ambiente y mantenida en baño a 37° C por 1 h. Los tripomastigotes del sobrenadante fueron aislados y centrifugados a

5000 x g durante 5 min a temperatura ambiente. El sobrenadante fue descartado y el número de parásitos se determinó por recuento en cámara de Neubauer.

Infección de células en cultivo con *T. cruzi*

Las células cultivadas en monocapa fueron infectadas con parásitos de la cepa RA en una proporción de 5:1 (parásito: célula). El tiempo de exposición al parásito varió en función del experimento a realizar (ver Tabla 2).

Determinación de la concentración parasiticida de Bzl

Las células cardíacas fueron infectadas con 1×10^4 tripomastigotes de *T. cruzi*. Luego de 3hs, se realizaron cinco lavados con medio fresco DMEM: M-199 suplementado con 1% SFB para remover los parásitos libres. Las células infectadas fueron cultivadas por 48 hs y luego tratadas con 3, 15 o 75 μM de Bzl, por 72hs. Luego de ese tiempo, se obtuvo ADN genómico (ADNg) y se analizó la carga parasitaria celular por PCR cuantitativa a tiempo real (qPCR).

Ensayo para evaluar los efectos de fenofibrato en mediadores inflamatorios

Para evaluar el mecanismo de acción de Fen, las células cultivadas en monocapa fueron tratadas durante 30 minutos con 50, 100 o 150 μM de Fen e infectadas con *T. cruzi*. Estos experimentos se realizaron en presencia o ausencia de MK886, un potente inhibidor no competitivo de PPAR α . El tiempo de exposición al parásito varió en función del experimento a realizar (ver Tabla 2).

Estimulación de células en cultivo con LPS

Las células cultivadas en monocapa fueron estimuladas con LPS de *Escherichia coli* a una concentración de 10 $\mu\text{g/ml}$. En un trabajo previo del grupo, se ha demostrado que dicha concentración induce la respuesta inflamatoria en un cultivo primario de cardiomiocitos (Hovsepian et al., 2010). El tiempo de exposición al estímulo varió en función del experimento a realizar (ver Tabla 2)

Evaluación de los efectos de benznidazol sobre mediadores inflamatorios

Para evaluar el mecanismo de acción de Bzl, independiente de su capacidad parasiticida, las células cultivadas en monocapa fueron tratadas durante 30 minutos con 3, 15 o 75 μM de Bzl y estimuladas con 10 $\mu\text{g}/\text{ml}$ de LPS. El tiempo de exposición al estímulo varió en función del experimento a realizar (ver Tabla 2)

Tiempos de exposición de las células cardíacas a *T. cruzi* y/o LPS según el experimento

Para evaluar	Tiempo de exposición	
	<i>T. cruzi</i>	LPS
Parasitismo celular (qPCR)	120 horas	-
Expresión de citoquinas en células cardíacas (RT-qPCR)	-	4 horas
Expresión de NOS2 en células cardíacas (Wb)	48 horas	48 horas
Liberación de NO al sobrenadante celular (Griess)	48 horas	48 horas
Expresión de $\text{I}\kappa\text{B}\alpha$ en células cardíacas (Wb e Inmunocitoquímica)	15 y 30 minutos	30, 60 y 120 minutos
Expresión de p65 en células cardíacas (Wb)	-	30, 60 y 120 minutos

Tabla 2. Tiempos de exposición a *T. cruzi* y/o LPS según el experimento.

DETERMINACIÓN DE PARASITEMIA Y SUPERVIVENCIA

La presencia de parásitos en sangre fue evaluada por el método de microhematocrito (Feilij et al., 1983). La parasitemia fue analizada usando el método de Pizzi modificado por Brener (Brener, 1962) y se expresa como cantidad de parásitos por mililitro de sangre.

La supervivencia fue observada diariamente hasta el final de cada experimento. Las diferencias entre los grupos se analizaron mediante la prueba estadística de Kaplan-Meier.

ECOCARDIOGRAFÍA DOPPLER

La ecocardiografía transtorácica fue realizada utilizando un sistema de ultrasonido Acuson Sequoia C 512, con un transductor lineal de 14-MHz. Los experimentos ecocardiográficos fueron realizados bajo una anestesia suave (287,5 mg/kg de 2,2,2-Tribromoetanol 2,5%; Sigma-Aldrich). El plano de imagen de eje corto paraesternal bidimensional se utilizó para obtener trazados en modo M al nivel de los

músculos papilares. Las dimensiones internas y el espesor de la pared del ventrículo izquierdo fueron determinados en sístole y diástole usando métodos y recomendaciones de la Sociedad Americana de Ecocardiografía (Sahn et al., 1978). La fracción de eyección (FE) y fracción de acortamiento (FA) fue calculada usando índices eyectivos de la función sistólica. La FE fue estimada a partir de las dimensiones del ventrículo izquierdo por el método de cubos, utilizando la fórmula: $FE (\%) = [(DDVI^3 - DSVI^3) / DDVI^3] \times 100$, $FA (\%) = [(DDVI - DSVI) / DDVI] \times 100$, siendo DDVI el diámetro de fin de diástole y DSVI el diámetro de fin de sístole. El tiempo de relajación isovolumétrica (TRIV) fue medido a partir de estudios de *Eco-Doppler*. Estos ensayos fueron realizados por el Dr. Martín Donato y el Dr. Ricardo Gelpi del Instituto de Fisiopatología Cardiovascular (Facultad de Medicina de la Universidad de Buenos Aires) con nuestra asistencia, como parte de la colaboración establecida.

HISTOLOGÍA

Para analizar si los tratamientos afectan al número y tamaño de nidos de amastigotes en el tejido cardíaco, los órganos de ratones tratados y no tratados fueron fijados e incluidos en parafina. Seis secciones no contiguas de 5 μm de espesor fueron cortadas y teñidas con Hematoxilina-Eosina. El número y tamaño de nidos de amastigotes, así como la presencia de infiltrado inflamatorio se examinaron usando el microscopio Nikon Eclipse E 600 (Nikon Inc).

Además, evaluamos la presencia de tejido fibrótico, en cortes histológicos teñidos con Rojo de Picrosirio. Las imágenes fueron capturadas usando una cámara digital Spot RT. Al menos 30 campos (400X) al azar se examinaron en cada sección (Mirkin et al., 1994).

OBTENCIÓN DE ADN GENÓMICO

El ADNg total proveniente de corazones o de células cardíacas, pertenecientes a todos los grupos experimentales, fue aislado utilizando el método de extracción con fenol/cloroformo/alcohol isoamílico. La concentración de ADNg de cada muestra fue determinada mediante espectrofotometría a una absorbancia de 260 nm. La pureza del ADNg fue determinada con la razón entre 260/280 nm.

GENERACIÓN DE ESTÁNDARES DE PCR

Los estándares para las reacciones de qPCR fueron generados usando 50 mg de tejido cardíaco normal (o 1 millón de células cardíacas) a las que se le agregaron 1×10^7 trypomastigotes sanguíneos de la cepa RA de *T. cruzi*. Se obtuvo el ADN_g siguiendo los pasos detallados en la sección anterior. Una vez resuspendido, se realizaron diluciones seriadas (1/10) del ADN, utilizando como diluyente una solución de 25 µg/ml de ADN de tejido normal. Cada uno de los puntos de la curva estándar, conteniendo 50 ng de ADN genómico, fue sometido a qPCR.

OBTENCIÓN DE ARN TOTAL Y RETROTRANSCRIPCIÓN A ADN COMPLEMENTARIO

El ARN total proveniente de corazones de ratones o de células cardíacas, pertenecientes a todos los grupos experimentales, se extrajo mediante la utilización del reactivo de Quick-zol, siguiendo las instrucciones del proveedor. El ARN total obtenido fue tratado con la endonucleasa RQ1-DNase, que degrada ADN de simple y doble cadena. La concentración de ARN de cada muestra fue determinada mediante espectrofotometría a una absorbancia de 260 nm. La pureza del ARN fue determinada con la razón entre 260/280 nm. El ARN (1 µg por muestra) fue transcrito en reversa, utilizando el reactivo M-MLV Reverse Transcriptase[®], en presencia de oligo dT, una mezcla de deoxinucleótidos y un inhibidor de ARN para obtener ADN complementario (ADN_c), según indicaciones del fabricante.

REACCIÓN EN CADENA DE LA POLIMERASA CUANTITATIVA (qPCR) Y CUANTITATIVA EN TRANSCRIPCIÓN REVERSA (RT-qPCR)

Los ensayos de qPCR y RT-qPCR fueron realizados con el reactivo EvaGreen empleando un detector de secuencias Applied Biosystems 7500.

Las secuencias de los cebadores para RT-qPCR fueron diseñadas utilizando la herramienta *Primer-BLAST*, que combina Primer3 y BLAST, desarrollada en los Institutos de Salud de los Estados Unidos (NIH, USA), y analizadas con el programa *Oligo Primer Analysis Software 7* (Molecular Biology Insights, Inc., USA). Todas las muestras fueron normalizadas con el ARN_r 18S.

En el caso de la carga parasitaria por qPCR, se utilizó la secuencia TCZ, que amplifica un producto 182 pares de bases de ADN satélite altamente repetitivo de *T. cruzi*, y TNF- α como gen constitutivo. Dichas secuencias fueron tomadas de la bibliografía, ya que las mismas se encuentran validadas para la cuantificación de *T. cruzi* (Cummings et al., 2003).

Todas las secuencias utilizadas con sus respectivas Temperaturas de fusión (T_m) se muestran en la Tabla 3.

Nombre	<i>Forward</i> o directo (5' – 3')	<i>Reverse</i> o indirecto (5' – 3')	T_m (°C)
NOS2	CACAGCAATATAGGCTCATCCA	GGATTTTCAGCCTCATGGTAAAC	60
IL-6	TGATGCACTTGCAGAAAACAA	GGTCTTGGTCCTTAGCCACTC	60
IL-1β	TTGACAGTGATGAGAATGACC	CAAAGATGAAGGAAAAGAAGG	57
18S	AACACGGGAAACCTCACCC	CCACCAACTAAGAACGGCCA	60
PPARα	GCTGGTGTACGACAAGTG3	GTGTGACATCCCGACAGAC	57
TNF-α	GCTCTTGCCACAMGGGTGC	CCAAGCAGCGGATAGTTTCCAG	60
CTGF	CCTAAAATCGCCAAGCCTGT	CACCCCGCAGAACTTAGCC	61
TCZ	TCCCTCTCATCAGTTCTATGGCCC	CAGCAAGCATCTATGZCACTTAGACCCC	63
TNF-α	TCCCTCTCATCAGTTCTATGGCCCA	CAGCAAGCATCTATGCACTTAGACCCC	63

Tabla 3. Secuencias de los cebadores para RT-qPCR (rojo) y qPCR (azul).

T_m = temperatura a la cual la mitad de las moléculas de cebador están apareadas con el ADN molde.

El protocolo de PCR utilizado para todos los casos se muestra en la Tabla 4.

Cantidad de ciclos	Temperatura	Tiempo
1	52° C	2 min
1	95° C	15 min
40	95° C	15 s
	T_m específico de cada cebador	30s
	72° C	1 min
<i>Curva de disociación</i>		

Tabla 4. Protocolo de ciclado utilizado para los ensayos de RT-qPCR y qPCR.

Para la RT-qPCR, los valores de expresión cuantitativa fueron extrapolados a partir de curvas patrón para 18S por duplicado. La cuantificación y eficiencia de las reacciones se calcularon utilizando el método comparativo $2^{-\Delta\Delta Ct}$ (Schmittgen et al., 2008). Los valores obtenidos fueron promediados con los replicados en cada reacción, y las veces de inducción fueron determinadas considerando 1 al valor obtenido en el tiempo cero (control).

La carga parasitaria (parásitos equivalentes/50ng de ADN) por qPCR fue estimada utilizando una curva estándar. Para la normalización de cada muestra, se calculó la relación entre la concentración de la secuencia TCZ (ADN de *T. cruzi*) y la concentración del gen de referencia TNF- α .

PREPARACIÓN DE EXTRACTOS PROTEICOS

Tanto los corazones de ratones como las células cardíacas, fueron mantenidos a -80° C hasta el momento de preparación de los extractos.

Obtención de extractos citosólicos y nucleares

Los corazones se homogeneizaron con un dispersor Ultra-Turrax (IKA-Werke, Alemania) en 300 μ l de Buffer H. Las células infectadas con *T. cruzi* o estimuladas con LPS (y sus controles) fueron resuspendidas en 90 μ l del mismo Buffer.

Los homogenatos fueron mantenidos en hielo por 15 min al cabo de los cuales se agregó Nonidet P-40 10%, se agitaron vigorosamente por 15 s y se centrifugaron en frío a 1600 x g durante 30 s. El sobrenadante fue congelado y almacenado a -20° C (extracto citosólico). El precipitado se resuspendió en 70 μ l de Buffer C frío, y luego se agitó durante 30 min a 4° C. El sobrenadante obtenido fue centrifugado 15 min a 1600 x g y 4° C y almacenado a -80° C (extracto nuclear) (Goren et al., 2004).

Obtención de extractos totales

Los corazones de los ratones fueron homogeneizados con Ultra-Turrax en 300 μ l de Buffer de lisis RIPA modificado. A las células cardíacas infectadas con *T. cruzi* o estimuladas con LPS (y sus controles), se les agregó 90 μ l de Buffer de lisis RIPA modificado.

Luego se incubaron en cámara refrigerada durante 30 min y en agitación constante. Rápidamente, se las centrifugó a 7000 x g a 4° C durante 15 min. El sobrenadante obtenido fue traspasado a un tubo limpio y mantenido a -20° C.

CUANTIFICACIÓN DE PROTEÍNAS

La determinación de proteínas se realizó según el método descrito por Bradford (Bradford MM, 1976), utilizando el reactivo Bio-Rad Protein Assay y albúmina sérica bovina (BSA) (1 mg/ml) como patrón. La concentración de proteínas presente en cada muestra se calculó a partir de la curva patrón (entre 0 y 50 µg/ml) cuya absorbancia fue medida a una longitud de onda de 595 nm en un espectrofotómetro (Thermo scientific).

ANÁLISIS DE PROTEÍNAS POR WESTERN BLOT

Los extractos de proteínas nucleares, citosólicos y totales, previos a ser sometidos a electroforesis, fueron calentados a 95° C durante 10 min con Buffer de Laemmli. Las muestras (50 µg de proteínas) fueron sometidas a electroforesis (90 min a 90-120 volts) en geles de poliacrilamida al 10-12% SDS-poliacrilamida (acrilamida/bisacrilamida, 29:1) en condiciones desnaturalizantes. Finalizada la electroforesis, las proteínas fueron transferidas a membranas Immobilon-P, a una intensidad constante de 400 mA por 120 min. Luego, las membranas fueron bloqueadas durante 1 h a temperatura ambiente con una solución de leche descremada en polvo (Svelty-Nestlé) al 5% en PBS 1X. Las membranas se incubaron toda la noche a 4° C con los anticuerpos primarios específicos indicados, diluidos en PBS 1X. Transcurrido este tiempo, se lavaron con PBS-Tween y se incubaron durante 1 h a temperatura ambiente con el anticuerpo secundario conjugado con peroxidasa. Finalizada la incubación, se realizaron 3 lavados de 10 min con PBS-Tween y las membranas fueron tratadas para su revelado con los reactivos quimioluminiscentes (Sigma-Aldrich Co.), en un gabinete Image Quant 300 (GE Healthcare) siguiendo las instrucciones del fabricante. La Intensidad de las bandas se analizó utilizando el programa de dominio público y fuente abierta ImageJ, desarrollado en los Institutos de Salud de los Estados Unidos (NIH, USA).

DETERMINACIÓN DE LOS NIVELES NITRITOS/NITRATOS

A partir de sobrenadantes de cultivo de cardiomiocitos, se analizaron los niveles de NO acumulados (NO_x), utilizando el método de Griess (Granger et al., 1996). El mismo consiste en reducir los nitratos a nitritos utilizando Sulfanilamida y Naftietilendiamina, que luego son cuantificados mediante espectrofotometría. La absorbancia a 540 nm fue comparada con una curva estándar de NaNO_2 .

ENSAYO POR INMUNOABSORCIÓN LIGADO A ENZIMAS (ELISA)

La concentración de IL-6 y TNF- α fue evaluada en sueros de ratones infectados y sin infectar, tratados o no, por el método de ELISA, siguiendo las instrucciones del fabricante. La reacción fue detectada incubando las muestras con una solución de estreptavidina conjugada con peroxidasa de rábano picante (strep-HRP, dilución 1:200). Luego se les agregó la solución sustrato (ABTS, 2,2'-Azino-bis(3-Ethylbenzthiazoline-6-Sulfonic Acid) a cada pocillo y se midió la absorbancia a 405 nm, restando la absorbancia basal. La concentración (pg/ml) presente en cada muestra se calculó a partir de la curva patrón de cada citoquina.

INMUNOCITOQUÍMICA

Las células cardíacas fueron crecidas sobre cubreobjetos redondos de cristal hasta un 40% de confluencia. Al finalizar el experimento correspondiente, los cardiomiocitos fueron lavados con PBS 1X, fijados y permeabilizados con metanol frío por 30 min y mantenidos a -20°C . Una vez fijadas, las células fueron bloqueadas durante 30 min con una solución de BSA al 3% en PBS 1X e incubadas durante 1 h a temperatura ambiente con suero policlonal de conejo dirigido contra I κ B α o NOS2 en dilución 1:200. Luego de tres lavados con PBS 1X, se agregó a los preparados una dilución apropiada de anticuerpo anti-IgG de conejo conjugado a FITC (1:3000). Los núcleos fueron teñidos con una solución 300 nM del agente intercalante 4,6-diamino 2-fenil-indol (DAPI). Los cubreobjetos fueron montados con glicerol al 10% en PBS 1X. Se observaron como mínimo 20 campos microscópicos al azar (400X) y se tomaron registros de 1000 células por preparado utilizando una cámara digital Spot RT

acoplada a un microscopio de fluorescencia Nikon Eclipse E600 (Nikon Inc., USA), suplementado con los filtros de excitación y emisión adecuados.

EVALUACIÓN DE LA ACTIVIDAD SÉRICA DE CREATINA KINASA

Se midió la actividad sérica de la enzima Creatina Kinasa como marcador de injuria cardíaca. Para tal fin se utilizó un kit comercial, siguiendo las indicaciones del fabricante (Wiener Lab, Rosario, Argentina). El ensayo se basa en la reducción de NADP⁺ (Nicotinamida Adenina Dinucleótido Fosfato) y el incremento de la absorbancia, medido a 340nm en un espectrofotómetro.

COMPOSICIÓN DE SOLUCIONES *BUFFER*

Nombre del <i>Buffer</i>	Composición	Utilizado para:
HBSS 1	0,4 mg/ml KCl; 0,06 mg/ml KH ₂ PO ₄ ; 8,0 mg/ml NaCl y 0,05 mg/ml Na ₂ HPO ₄ , pH 7,4	Cultivo primario de células cardíacas de ratón.
HBSS 2	0,14 mg/ml CaCl ₂ ; 0,047 mg/ml MgCl ₂ ; 0,049 mg/ml MgSO ₄ ; 0,35 mg/ml NaHCO ₃ y 1,0 mg/ml D-glucosa; pH 7,40	
<i>Buffer</i> de lisis RIPA modificado	150 mM NaCl; 50 mM Tris-HCl (pH 7,40); 1% Triton X-100; 1 mM EDTA; 1 mM PMSF; 2.5 mg/mL; cocktail de inhibidores de proteasas (Sigma Aldrich); 1 mM Na ₃ VO ₄ ; 4,1 mM NaF.	Extracción de Proteínas Totales
<i>Buffer</i> H	HEPES 10 mM pH 7,9; EDTA 1 mM; EGTA 1 mM; KCl 10 mM; DTT 1mM; PMSF 0,5 mM; FNa 100 mM; Na ₃ VO ₄ 200 mM y cocktail de inhibidores de proteasas (Sigma Aldrich).	Extracción de Proteínas Citosólicas

<i>Buffer C</i>	HEPES 20 mM pH 7,9; NaCl 0,4 M; EDTA 1 mM; EGTA 1 mM; glicerol 20% DTT 1mM; PMSF 0,5 mM; FNa 100 mM; Na ₃ VO ₄ 200 mM y cocktail de inhibidores de proteasas (Sigma Aldrich).	Extracción de Proteínas Nucleares
<i>Buffer de Laemmli</i>	Tris-HCl 60 mM pH 6,8; SDS 2%; glicerol 10%; β-mercaptoetanol 3% y azul de bromofenol 0,005%	Western blot

Tabla 5. Composición y uso de las soluciones *buffer* utilizadas

ANÁLISIS ESTADÍSTICOS

Los resultados se expresan como la media de por lo menos tres experimentos independientes \pm error estándar de la media (EEM) para cada tratamiento (siete ratones o tres réplicas de cultivo/grupo). El test de ANOVA de un factor fue usado para analizar la diferencia estadística de las diferencias observadas entre los grupos experimentales. Para realizar comparaciones múltiples *a posteriori* entre todos los grupos, se realizó una prueba de Tukey.

Las diferencias se consideraron significativas cuando $P < 0,05$. Todos los análisis fueron realizados utilizando el Software Prism 7.00 (GraphPad, USA).

RESULTADOS

*“Si logras fe en ti mismo y en lo mejor de quienes te rodean,
fe en nuestro mundo y en la vida siempre abierta al futuro,
empequeñecerá todo problema que hasta hoy te pareció*

invencible”

Silo. 1981

CAPÍTULO 1. EFICACIA PARASITICIDA DE BAJAS DOSIS DE BENZNIDAZOL, EN UN MODELO MURINO DE INFECCIÓN CON UNA CEPA DE ALTA VIRULENCIA DE *TRYPANOSOMA CRUZI*

“Ay ... la dama espectral y silenciosa, su reino es la miseria, por las noches recorre con sigilo diseminando espanto los ranchos de adobe y paja, los ranchos pobres. Una y otra vez desplegará sus velos para cegar cualquier descuido. Una y otra vez hasta que su paso sea ignorado. Oh ... la dama nocturna, su destino es clavar un largo puñal y de sangre saciarse, arrebatarse la luz de los ojos de aquellos niños que duermen en sus descarnados catres, los blancos sueños del hambre. Ay ... la dama oscura y parsimoniosa que reina en el dolor del desamparo y el olvido. Ejércitos la habitan y secundan, ¡son sus huéspedes! que esperando glorificarse en la herida, navegarán en un río de plasma y tomarán el corazón de los indefensos, hasta matarlos”

Vinchuca. Alicia De Laforé. 2017

Actualmente el tratamiento tripanocida para la mayoría de los pacientes con serología positiva está indicado por el Ministerio de Salud argentino, ya que ha sido ampliamente demostrado que la persistencia parasitaria es uno de los factores que contribuyen al desarrollo de la cardiopatía chagásica crónica (Ministerio de Salud de Argentina, 2013). De las dos drogas tripanocidas conocidas, en Argentina solo está disponible el Bzl. Este puede generar efectos adversos de variada severidad relacionados con la dosis, que pueden llevar a la interrupción del tratamiento. Por ello, en la primera parte de este trabajo nos propusimos evaluar, en un modelo *in vivo* de infección letal con *T. cruzi*, si existe actividad tripanocida a dosis más bajas de Bzl que las reportadas en la bibliografía.

Estudio de la eficacia parasiticida de bajas dosis de benznidazol

Con el objetivo de evaluar si Bzl tiene actividad tripanocida a dosis más bajas que las usadas actualmente en modelos experimentales (100 mg/kg/día), nos propusimos estudiar un modelo de infección de alta letalidad que nos permitiera evidenciar el éxito o falla del tratamiento.

Para ello, ratones BALB/c fueron infectados vía intraperitoneal con 500 tripomastigotes de la cepa RA de *T. cruzi*, altamente virulenta. En este modelo, la parasitemia fue evidenciada los 7 días post infección (d.p.i), por microhematocrito, con un máximo a los 13 d.p.i que coincide con la mortalidad del 100% de los ratones (Figura 1; **Error! No se encuentra el origen de la referencia.**).

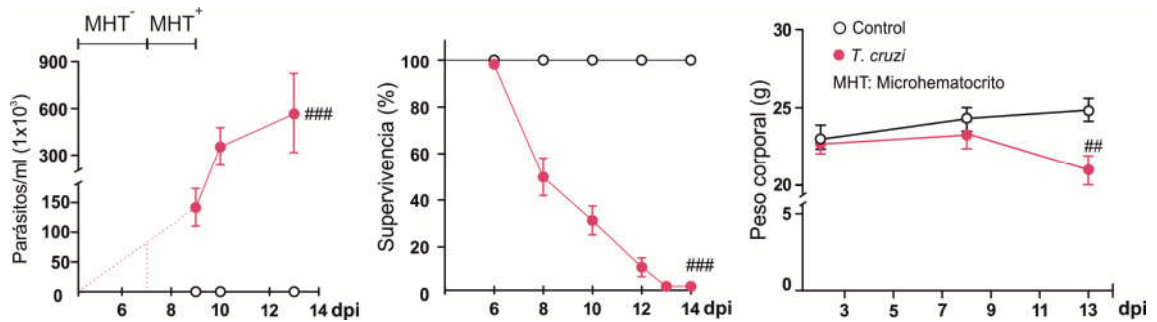


Figura 1. Parasitemia, supervivencia y peso corporal de ratones infectados con *Trypanosoma cruzi*.

Ratones BALB/c fueron infectados con 500 tripomastigotes de la cepa RA de *T. cruzi*, por vía intraperitoneal. La parasitemia (parásitos/ml) y el peso (gramos) fueron evaluados. La supervivencia fue observada diariamente, hasta el fin del experimento y analizada por el método de Kaplan Meyer. Los resultados expresan la media de 3 experimentos independientes (7 ratones / grupo) ± Error estándar. ##P < 0,001, ###P < 0,0001 vs. ratones control.

Desde que la parasitemia es detectable (7 d.p.i), diferentes grupos fueron tratados diariamente con 10 o 25mg/kg/día (dosis bajas) o 100 mg/kg/día (dosis de referencia) de Bzl, durante 30 días. La ventaja de este modelo, en el que el tratamiento comienza luego de hacerse evidente la parasitemia, es que nos aseguramos de que el ratón estaba efectivamente infectado y se evitan conclusiones erróneas acerca de la eficacia de la droga parasiticida. Al finalizar el experimento la dosis de 25 mg/kg/día de Bzl tornó indetectable la parasitemia (evaluada por microhematocrito), igual que la dosis de referencia (100 mg/kg/día) (Figura 2).

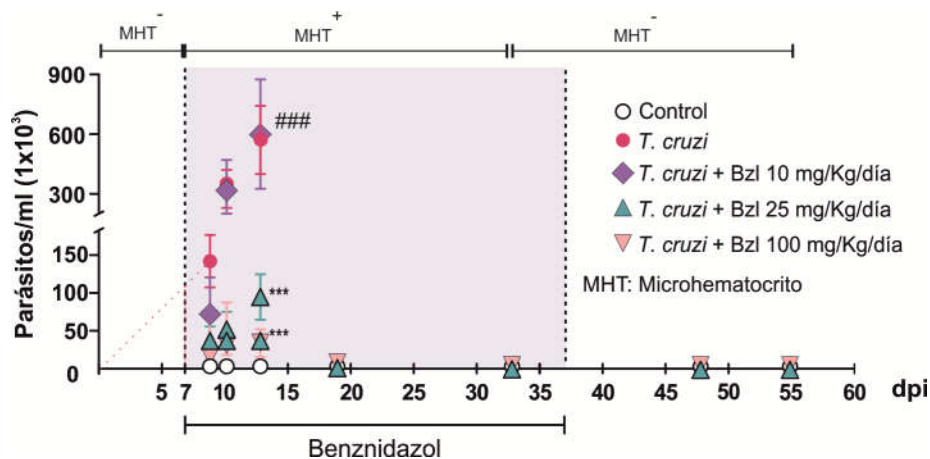


Figura 2. El tratamiento con benznidazol es efectivo a una dosis más baja que la usual. Ratones BALB/c

fueron infectados con 500 tripomastigotes de la cepa RA de *T. cruzi*, y tratados con 10, 25 o 100 mg/Kg/día de benznidazol (Bzl), por 30 días consecutivos. La presencia de parásitos se evaluó mediante microhematocrito, y la parasitemia (parásitos/ml) por el método de Pizzi modificado por Brener. Los resultados expresan la media de 3 experimentos independientes (7 ratones / grupo) ± Error estándar.

***p < 0,001 vs. ratones infectados con *T. cruzi*. ###P < 0,0001 vs. ratones control.

Además, con estas dosis, no se observan diferencias significativas en el peso corporal de los ratones a lo largo del ensayo, y ambas presentan una supervivencia del 100% (Figura 3).

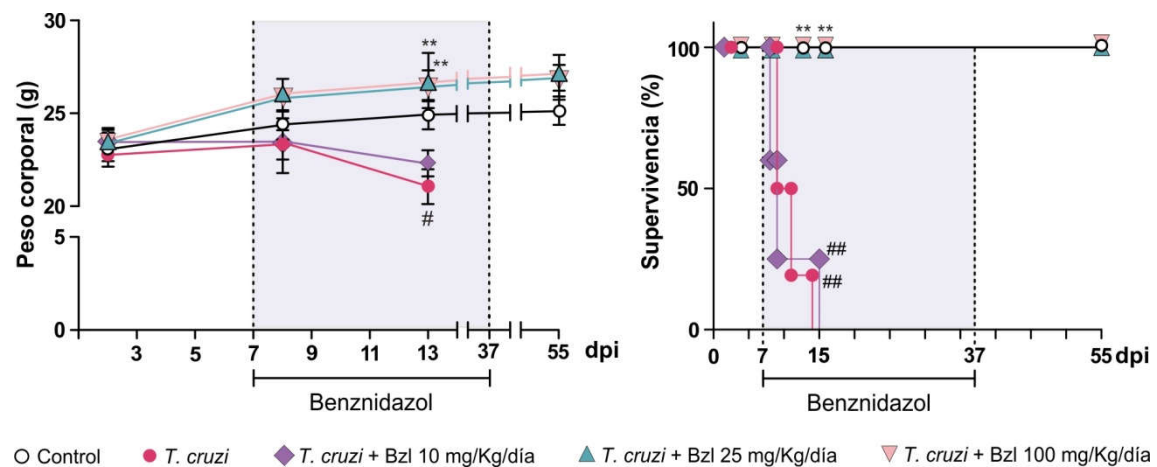


Figura 3. Evaluación de supervivencia y peso corporal en ratones infectados con *Trypanosoma cruzi* y tratados con benznidazol. Ratones infectados fueron tratados con 10, 25 o 100 mg/Kg/día de benznidazol (Bzl). Se evaluó el peso (gramos). La supervivencia fue observada diariamente, hasta el fin del experimento y analizada por el método de Kaplan Meyer. Los resultados expresan la media de 3 experimentos independientes (7 ratones / grupo) \pm Error estándar. ** $p < 0,001$ vs. ratones infectados con *T. cruzi*. # $P < 0,05$, ## $P < 0,001$ vs. ratones control.

Por el contrario, el tratamiento con la dosis de 10 mg/kg/día no muestra efecto antiparasitario, observándose una mortalidad del 100% y curvas de parasitemia y peso corporal similares a las de los ratones infectados sin tratar (Figuras 2 y 3).

Evaluación de los efectos de bajas dosis de benznidazol sobre la respuesta inflamatoria cardíaca y sobre marcadores de injuria tisular como la Creatina Kinasa

Dado que Bzl 25 mg/Kg/día logró mantener la supervivencia de los ratones al 100% y la parasitemia indetectable, tal como lo hace la dosis de referencia, nos planteamos investigar su papel en el parasitismo tisular y la reacción inflamatoria en el corazón.

En los ratones que fueron tratados con Bzl 25 mg/Kg/día, la histoarquitectura del corazón está conservada, y no se evidencian células inflamatorias ni tampoco nidos de amastigotes. Mientras que los ratones infectados y sin tratamiento mostraron una intensa respuesta inflamatoria que rodea a numerosos nidos de amastigotes, tanto en aurícula como en ventrículo (Figura 4).

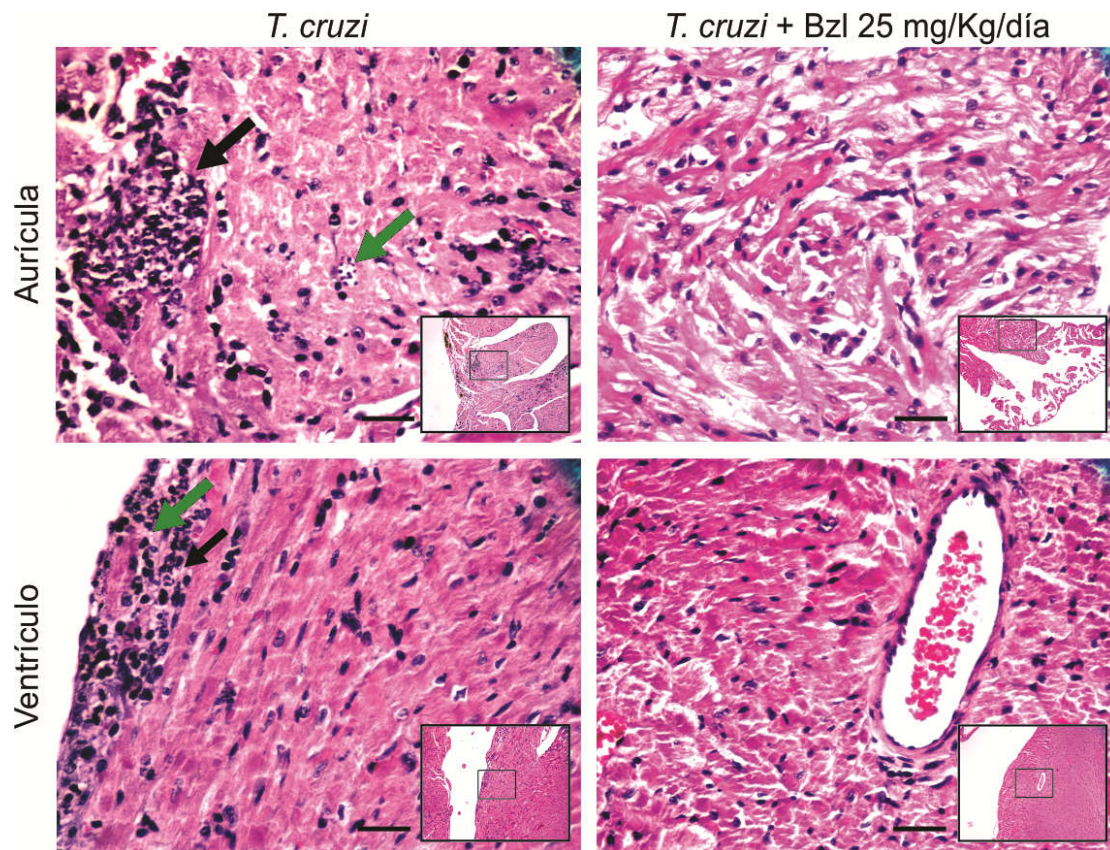


Figura 4. Ausencia de nidos de amastigotes y respuesta inflamatoria atenuada frente al tratamiento con baja dosis de Bzl. La presencia de nidos de amastigotes y la reacción inflamatoria fue analizada en secciones histológicas de aurícula (paneles superiores) o ventrículo (paneles inferiores) de ratones infectados a los 15 d.p.i (Paneles izquierdos), o infectados y tratados con benznidazol (Bzl) 25 mg/kg/día (paneles derechos) a los 55 d.p.i. La reacción inflamatoria de ratones infectados con *T. cruzi* es señalada con flecha negra y los nidos de amastigotes con Flecha verde. Tinción con Hematoxilina-Eosina. Magnificación: 400x. Vista panorámica del área detallada: 100x. Barra: 100 μ m

Para confirmar que la ausencia de parásitos en los cortes histológicos es tal, evaluamos la presencia parasitaria por una técnica de alta sensibilidad como la PCR cuantitativa a tiempo real (qPCR), a partir de ADN genómico (ADNg) de tejido cardíaco. Para ello, utilizamos los cebadores TCZ que amplifican 182 pares de bases de una secuencia satélite de ADN altamente repetitivo de *T. cruzi* (Cummings et al., 2003; Duffy et al., 2009).

En la Tabla 1 podemos observar que no se obtuvo amplificación de ADNg de TCZ en los corazones de ratones tratados, lo que confirma que Bzl 25 elimina los parásitos, tanto de la sangre como del corazón.

	<i>T. cruzi</i>	<i>T. cruzi</i> + Bzl
Parásitos equivalentes cada 50 ng de ADNg total ($\times 10^6$)	1,64 \pm 0,54	ND ***

Tabla 1. Benznidazol elimina la carga parasitaria tisular en ratones infectados con *Trypanosoma cruzi*.

La carga parasitaria del corazón fue detectada por qPCR de ratones infectados a los 15 d.p.i o ratones infectados y tratados con benznidazol (Bzl 25 mg/kg/día) a los 55 d.p.i. ND= No detectable. Los resultados expresan la media de 3 experimentos independientes (7 ratones / grupo) \pm Error estándar. ***P < 0,0001 vs. ratones infectados con *T. cruzi*.

Por otra parte, se evaluaron los cambios en la actividad de la enzima creatina kinasa (CK) debido a la infección, como un marcador bioquímico de injuria cardíaca. Pudimos corroborar que el tratamiento con Bzl 25 mg/Kg/día revirtió significativamente el aumento de la actividad sérica de CK, sugiriendo que la injuria tisular fue prevenida por Bzl (Figura 5).

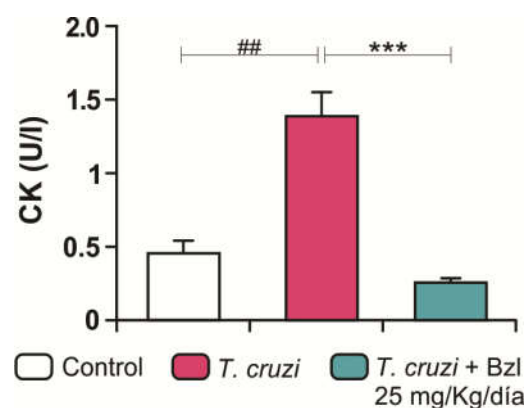


Figura 5. Benznidazol normaliza la actividad de creatina kinasa en ratones infectados con *Trypanosoma cruzi*. La actividad sérica de creatina kinasa (CK) fue evaluada en ratones infectados con *T. cruzi* (15 d.p.i), o infectados y tratados con benznidazol (Bzl) 25 mg/kg/día (55 d.p.i). Los resultados expresan la media de 3 experimentos independientes (7 ratones / grupo) \pm Error estándar. ***P < 0,0001 vs. ratones infectados con *T. cruzi*. ##P < 0,001 vs. ratones control.

Además de su actividad parasitocida, ha sido demostrado que Bzl a altas dosis modula citoquinas proinflamatorias tanto en modelos de estimulación con LPS *in vitro* (Revelli et al., 1999; Piaggio et al., 2001) como en un modelo *in vivo* de sepsis (Pascutti et al., 2004; Ronco et al., 2011). En este trabajo nos planteamos determinar si Bzl, a dosis bajas, es capaz de modular la expresión de mediadores inflamatorios en un modelo de Chagas experimental. Para ello, a partir de corazones de ratones infectados y tratados con Bzl 25 mg/Kg/día, cuantificamos los niveles de ARNm de IL-1 β e IL-6 mediante PCR a tiempo real con Retrotranscripción (RT-qPCR). Pudimos observar que la infección induce la expresión de estas citoquinas y el tratamiento con Bzl 25 mg/Kg/día la inhibe (Figura 6).

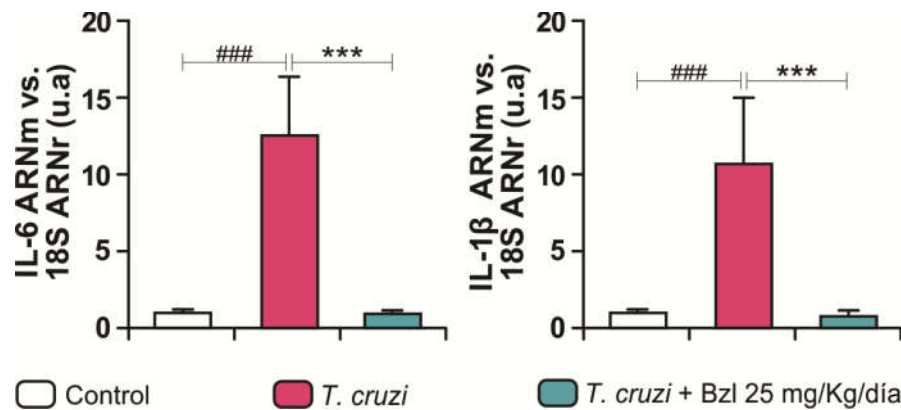


Figura 6. La expresión de citoquinas proinflamatorias es inhibida por benznidazol, en corazones de ratones infectados con *Trypanosoma cruzi*. Los niveles de ARNm de IL-6 e IL-1β fueron analizados mediante RT-qPCR en corazones de ratones infectados (15 d.p.i), o de ratones infectados y tratados con benznidazol (Bzl) 25 mg/ kg/día (55 d.p.i). Los resultados de RT-qPCR fueron normalizados contra ARNr 18S, y expresan la media de 3 experimentos independientes (7 ratones / grupo) ± Error estándar. ***P < 0,0001 vs. ratones infectados con *T. cruzi*. ### P<0,0001 vs. ratones control.

Además, la expresión de la enzima típicamente inflamatoria NOS2, fue estudiada en corazón mediante RT-qPCR y Western blot (Wb). La Figura 7 muestra que el tratamiento con Bzl 25 mg/Kg/día inhibe la expresión de NOS2 inducida por la infección, tanto a nivel de ARNm como de su proteína.

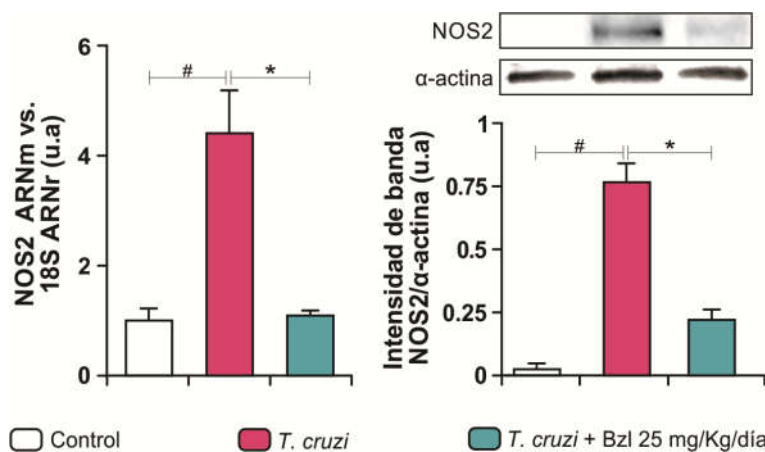


Figura 7. La expresión de NOS2 es inhibida por benznidazol en ratones de corazones infectados con *Trypanosoma cruzi*. Los niveles de ARNm de NOS2 y la expresión de la enzima NOS2 fueron determinados en corazones de ratones infectados (15 d.p.i), o de ratones infectados y

tratados con benznidazol (Bzl) 25 mg/kg/día (55 d.p.i), por RT-qPCR y Western blot con cebadores y anticuerpos específicos, respectivamente. Los resultados de RT-qPCR fueron normalizados contra ARNr 18S. Los niveles de proteínas fueron normalizados contra α-actina. Los resultados expresan la media de 3 experimentos independientes (7 ratones / grupo) ± Error estándar. *P < 0,05 vs. ratones infectados con *T. cruzi*. # P < 0,05 vs. ratones control.

Estudio de las propiedades antiinflamatorias de bajas dosis de Bzl en un modelo *in vitro* de células cardíacas murinas

Ha sido descrito que la infección con *T. cruzi* produce una intensa respuesta inflamatoria, la cual es crítica para el control de la evolución de la enfermedad de Chagas. Como parte de dicha respuesta, trabajos previos de nuestro grupo demuestran la expresión de marcadores típicamente inflamatorios, como la NOS2 con altos niveles de liberación de óxido nítrico (NO), o citoquinas inflamatorias como IL-1 β , IL-6 y TNF- α , en cardiomiocitos infectados *in vitro* y en modelos de infección *in vivo* (Hovsepian et al., 2011; Penas et al., 2013).

Otros autores han reportado que Bzl a altas concentraciones, que van desde 0,1 mM a 1mM, poseen efecto inhibitorio sobre la producción de NO dependiente de NOS2 en macrófagos activados *in vitro*, estimulados con LPS (Revelli et al., 1999). En este sentido, nos pareció interesante evaluar el efecto de bajas concentraciones de Bzl sobre la respuesta inflamatoria *in vitro*, ya que esto facilitaría el estudio de las vías de señalización involucradas.

Los cardiomiocitos aislados fueron estimulados con LPS, y no infectados con *T. cruzi*, para evitar que el efecto parasiticida de Bzl enmascare su efecto antiinflamatorio. El hecho de que *T. cruzi* posea componentes que inducen inflamación mediante el reconocimiento de TLR2 / TLR6 y TLR4, al igual que LPS, valida su uso para estudiar estos efectos. Sin embargo, nos pareció relevante que las concentraciones utilizadas en estos ensayos, fueran además parasiticidas.

En primer lugar, nos propusimos evaluar cuál era la mínima dosis de Bzl con efecto parasiticida *in vitro*. Las células cardíacas fueron infectadas con *T. cruzi* por 48 h, e incubadas con 3 μ M, 15 μ M (concentraciones bajas) o 75 μ M (concentración de referencia) de Bzl. Luego de 72h de tratamiento, se obtuvieron extractos de ADNg y se analizó la carga parasitaria por qPCR.

Observamos que Bzl 15 μ M elimina el parasitismo celular al igual que la dosis de referencia de 75 μ M (Figura 8). Si bien la concentración de 3 μ M disminuye significativamente el parasitismo, no logra eliminarlo completamente.

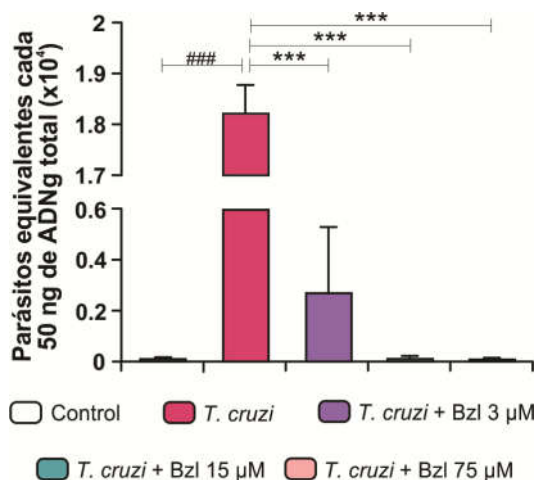


Figura 8. Efecto tripanocida de benznidazol en cultivos primarios de cardiomiocitos infectados. Cardiomiocitos fueron infectados con *T. cruzi* por 48h y tratados con 3, 15 o 75 μM de benznidazol (Bzl) por 72h adicionales. La carga parasitaria fue evaluada por qPCR. Los resultados expresan la media de 3 experimentos independientes (3 réplicas / tratamiento) ± Error estándar. ***P < 0,0001 vs. células infectadas sin tratar. ###P < 0,0001 vs. células control.

La viabilidad celular fue estudiada luego del tratamiento con distintas concentraciones de Bzl, y la misma no se vio afectada por ninguna de las concentraciones ensayadas (Figura 9).

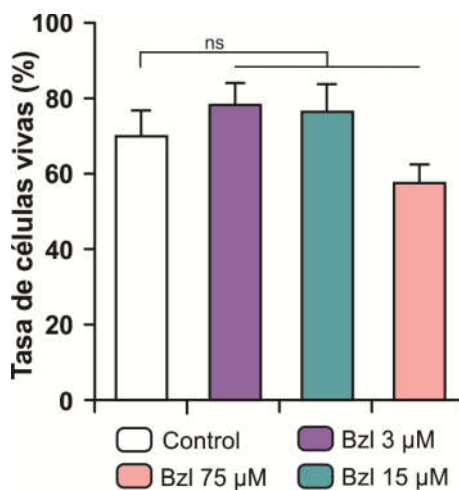


Figura 9. Efecto de benznidazol en la viabilidad de cardiomiocitos infectados con *Trypanosoma cruzi*. Cardiomiocitos fueron tratados con 3, 15 o 75 μM de benznidazol (Bzl) por 72h. La viabilidad celular fue evaluada a través del ensayo de exclusión vital con Azul Tripán y expresada como porcentaje de células totales. Los resultados expresan la media de 3 experimentos independientes (3 réplicas / tratamiento) ± Error estándar. ns= No significativo.

Para evaluar el efecto de Bzl sobre la respuesta inflamatoria, determinamos la expresión de la enzima NOS2 y la liberación de NOx al sobrenadante de células cardíacas estimuladas con 10µg/ml de LPS. Podemos observar que, si bien todas las concentraciones bajas estudiadas logran inhibir la expresión de la enzima NOS2, 3 µM no consigue disminuir significativamente la liberación de NOx al sobrenadante de cultivo, mientras que 15 µM la inhibe con igual efectividad que 75 µM (Figura 10).

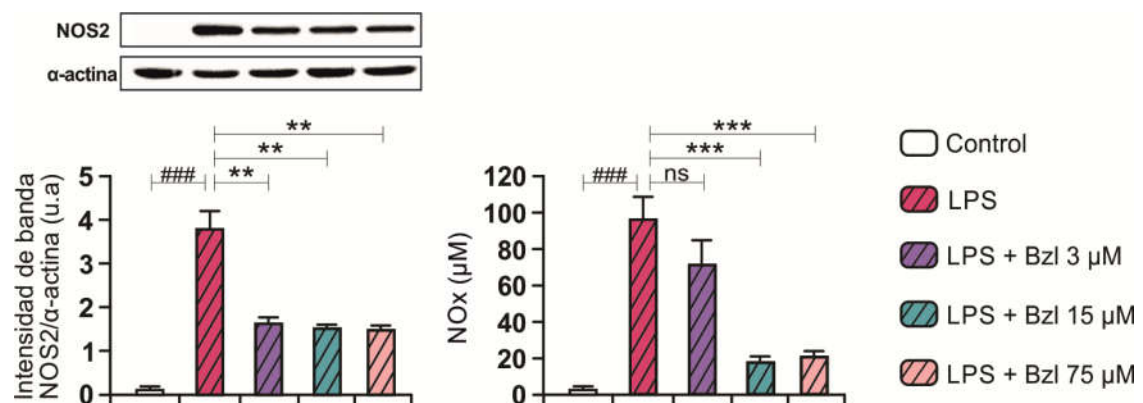


Figura 10. Benznidazol regula la expresión y actividad de NOS2 en cardiomiocitos estimulados con LPS.

Cardiomiocitos fueron tratados con 3, 15 o 75 µM de benznidazol (Bzl) por 30 minutos y luego estimulados con 10 µg/ml de LPS por 48h. La expresión de la enzima NOS2 fue determinada por Western blot con anticuerpos específicos y normalizada con α-actina. Los niveles de NOx fueron cuantificados por el método de Griess en sobrenadantes de cultivo. Los resultados expresan la media de 3 experimentos independientes (3 réplicas / tratamiento) ± Error estándar. ns= No significativo. **P < 0,001, ***P < 0,0001 vs. células estimuladas con LPS sin tratar. ###P < 0,0001 vs. Células control.

También, se realizaron ensayos de inmunocitoquímica con anticuerpos específicos para NOS2. Las células cardíacas, cultivadas sobre cubreobjetos redondos de cristal, se incubaron con Bzl 15µM, teniendo en cuenta los resultados anteriores, y se estimularon con LPS por 48h. Los ensayos de inmunocitoquímica evidenciaron la expresión de NOS2 en las células estimuladas, y observamos que efectivamente Bzl 15 µM inhibe su expresión intracelular (Figura 11).

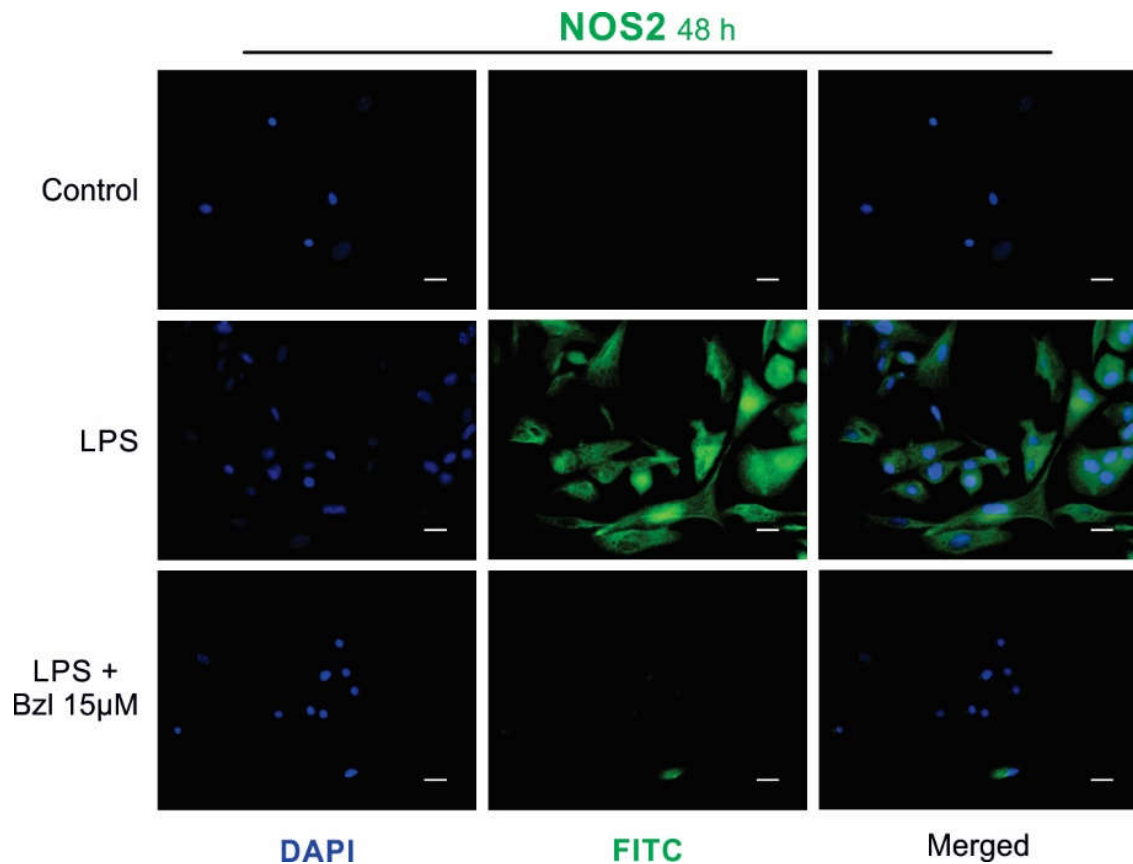


Figura 11. Benznidazol regula la expresión de NOS2 en cardiomiocitos estimulados con LPS. Cardiomiocitos fueron tratados con 15 μ M de benznidazol (Bzl) por 30 minutos y luego estimulados con 10 μ g/ml de LPS por 48h. La expresión de NOS2 fue detectada por inmunofluorescencia con un anticuerpo policlonal hecho en conejo, específico para NOS2, y un anticuerpo secundario IgG anti-conejo marcado con FITC. Los núcleos celulares fueron teñidos con DAPI (300nM). Se muestran microfotografías representativas (400x). Barra: 10 μ m.

Asimismo, las células fueron tratadas con Bzl 15 μ M, 30 minutos previos al estímulo con LPS, con el objeto de analizar su efecto sobre la expresión de mediadores inflamatorios. Luego de 4hs se observó un aumento de la expresión de IL-6 e IL-1 β , y el tratamiento con Bzl 15 μ M produce una disminución significativa de la expresión de ARNm de estos mediadores, evaluada por RT-qPCR (Figura 12).

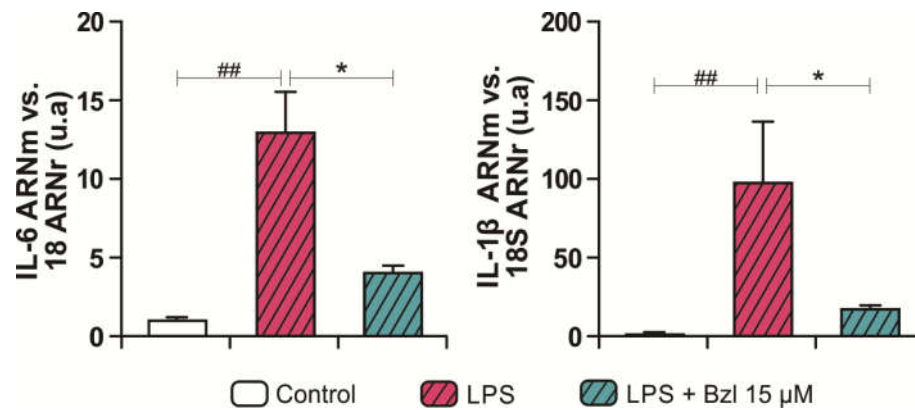


Figura 12. Benznidazol inhibe la expresión de citoquinas proinflamatorias en cardiomiocitos estimulados con LPS. Cardiomiocitos fueron tratados con 15 μ M de benznidazol (Bzl) por 30 min y luego estimulados con 10 μ g/ml de LPS por 4h. Los niveles de ARNm de IL-6 e IL-1 β fueron analizados mediante RT-qPCR y normalizados contra ARNr 18S. Los resultados expresan la media de 3 experimentos independientes (3 réplicas / tratamiento) \pm Error estándar. *P < 0,05 vs. células estimuladas con LPS sin tratar. ##P < 0,001 vs. células control.

Evaluación del papel de la vía NF- κ B en los efectos antiinflamatorios de Bzl, en cardiomiocitos estimulados con LPS

Ha sido demostrado previamente que altas concentraciones de Bzl (0,1-1 mM) ejercen sus efectos inmunomoduladores inhibiendo la vía NF- κ B (Revelli et al., 1999; Piaggio et al., 2001; Manarin et al., 2010; Ronco et al., 2011). Por ello, nos resultó de interés evaluar si esta vía está involucrada en los efectos de Bzl 15 μ M, una concentración parasitocida más baja que la reportada.

Para ello, cardiomiocitos fueron tratados con Bzl 30 minutos previos a la estimulación con LPS. La activación de la vía canónica de NF- κ B, puede ser evidenciada por la desaparición citosólica del inhibidor específico de esta vía, I κ B α , así como por la migración de la subunidad p65-NF- κ B al núcleo celular. En la Figura 13 podemos observar que el tratamiento con Bzl 15 μ M impide la degradación de I κ B α y la migración de p65 de la fracción citosólica. Esto sugiere que esta droga tripanocida inhibe la activación de NF- κ B a concentraciones más bajas que las previamente reportadas.

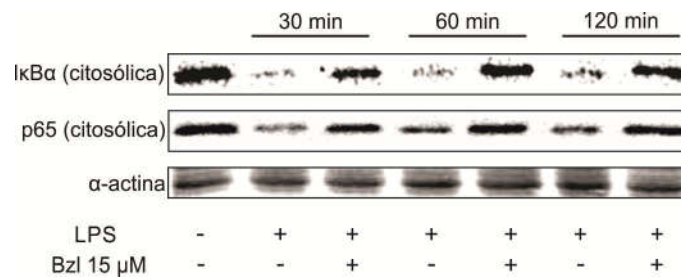


Figura 13. Benznidazol a bajas concentraciones inhibe la vía NF-κB. Cardiomiocitos fueron tratados con 15μM de benznidazol (Bzl) por 30 minutos y luego estimulados con 10 μg/ml de LPS por 30, 60 y 120 min. La expresión citosólica de IκBα y p65 fue determinada mediante Western blot utilizando anticuerpos específicos. Los niveles de proteínas fueron normalizados contra α-actina. Los resultados son representativos de 3 experimentos independientes.

Estos resultados fueron confirmados por inmunocitoquímica. La detección de IκBα por inmunofluorescencia muestra que el inhibidor desaparece del citoplasma cuando NF-κB es activado por LPS y que el tratamiento con 15 μM de Bzl impide la activación de esta vía (Figura 14).

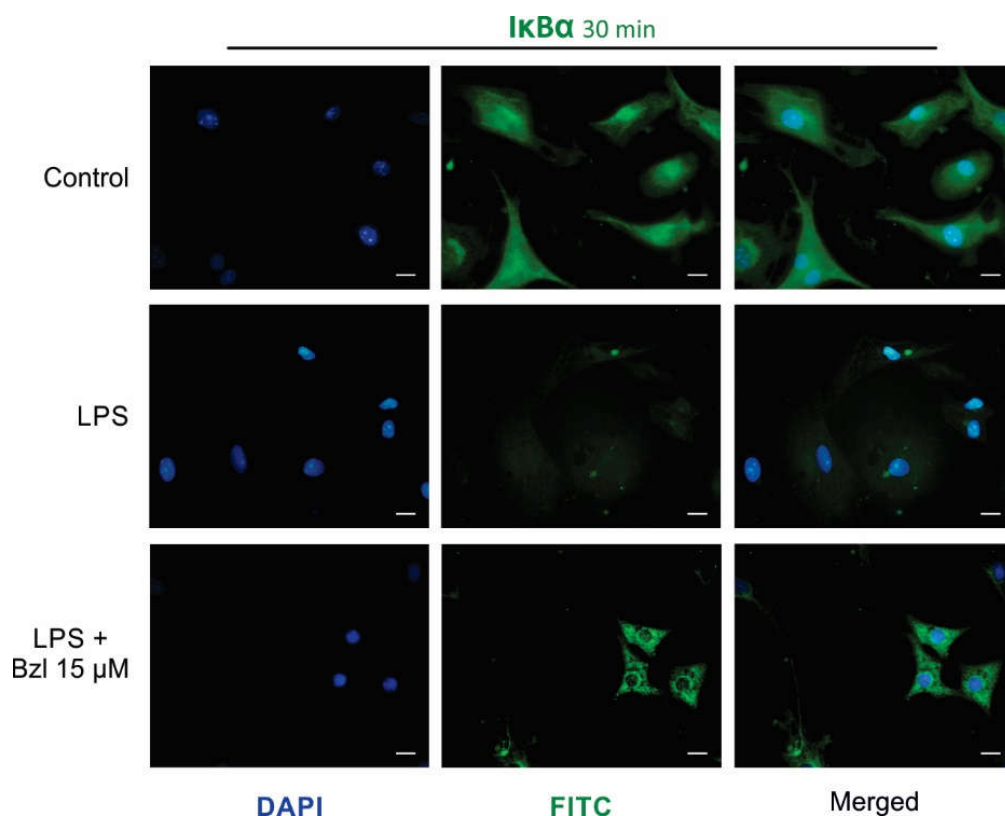


Figura 14. Benznidazol impide la degradación citosólica de IκBα. Cardiomiocitos fueron tratados con 15μM de benznidazol (Bzl) por 30 minutos y luego estimulados con 10 μg/ml de LPS por 30 min. La expresión de IκBα fue detectada por inmunofluorescencia con un anticuerpo policlonal hecho en conejo específico y un anticuerpo secundario IgG anti-conejo marcado con FITC. Los núcleos celulares fueron teñidos con DAPI (300nM). Se muestran microfotografías representativas (400x).

CAPÍTULO 2. EFICACIA DEL TRATAMIENTO CONJUNTO DE BENZNIDAZOL Y FENOFIBRATO EN LA DISFUNCIÓN VENTRICULAR E INFLAMACIÓN CARDÍACA EN UN MODELO MURINO DE INFECCIÓN MIXTA CON *TRYPANOSOMA CRUZI*

"No estalla como las bombas ni suena como los tiros. Como el hambre, mata callando. Como el hambre, mata a los callados: a los que viven condenados al silencio y mueren condenados al olvido. Tragedia que no suena, enfermos que no pagan, enfermedad que no vende. El mal de Chagas no es negocio que atraiga a la industria farmacéutica, ni es tema que interese a los políticos ni a los periodistas. Elige a sus víctimas en el poverío. Las muerde y lentamente, poquito a poco, va acabando con ellas. Sus víctimas no tienen derechos, ni dinero para comprar los derechos que no tienen. Ni siquiera tienen el derecho de saber de qué mueren".

Informe clínico, Eduardo Galeano. 2005

Caracterización de la disfunción ventricular en el modelo de infección

En trabajos previos del grupo se demostró que en la infección con el clon K98 de *T. cruzi*, la parasitemia y la supervivencia son consistentes con un modelo crónico de Chagas experimental (Penas et al., 2013). Sin embargo, al evaluar la función ventricular por ecocardiografía no hemos encontrado alteraciones significativas, en ninguno de los tiempos evaluados (Figura 15). Estos estudios fueron realizados en ratones BALB/c infectados con K98, donde se evaluó la fracción de eyección y fracción de acortamiento, que son dos parámetros ampliamente aceptados como marcadores de la función sistólica ventricular izquierda (Sekaran et al., 2017).

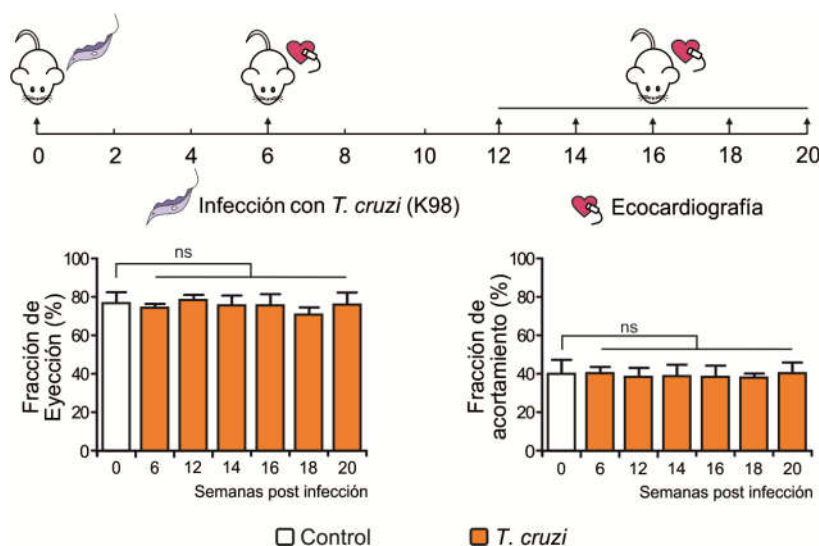


Figura 15. Modelo experimental de infección con el clon K98 de baja virulencia de *Trypanosoma cruzi*. Ratones BALB/c fueron infectados vía intraperitoneal (ip) con 1×10^5 tripomastigotes sanguíneos del clon de baja virulencia de

Trypanosoma cruzi K98 (CA-I), por 6, 12, 14, 16, 18 y 20 semanas. La fracción de eyección y acortamiento fueron evaluadas por ecocardiografía. Los resultados expresan la media de 3 experimentos independientes (7 ratones / grupo) ± Error estándar. ns= No significativo.

En la búsqueda de un modelo experimental con alteraciones cardíacas, realizamos también infecciones con baja cantidad de parásitos de la cepa de alta virulencia de *T. cruzi* (RA), por distintas vías de inoculación, y evaluamos la función ventricular mediante ecocardiografía, a las 4 y 20 semanas de infección. Si bien se consiguió mantener una alta tasa de supervivencia, tampoco se observó una diferencia significativa en la función sistólica (Figura 16).

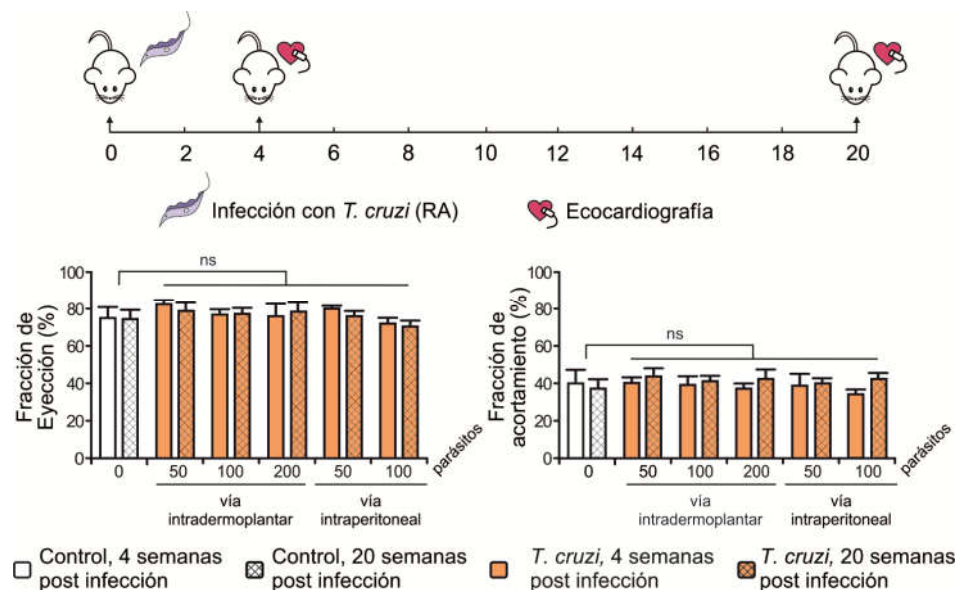


Figura 16. Modelo experimental de infección con la cepa RA de alta virulencia de *Trypanosoma cruzi*. Ratones BALB/c fueron infectados vía intraperitoneal (ip) con 50, 100, 200 o por vía intradermoplantar con 50 o 100, tripomastigotes sanguíneos de la cepa de alta virulencia de *Trypanosoma cruzi* RA, por 4 y 20 semanas. La fracción de eyección y acortamiento fueron evaluadas por ecocardiografía. Los resultados expresan la media de 3 experimentos independientes (7 ratones / grupo) \pm Error estándar. ns= No significativo.

Teniendo en cuenta estos resultados, continuamos la búsqueda de un modelo murino que simule la cardiopatía chagásica humana. Ha sido reportado que solo algunas cepas de ratón infectadas con ciertas cepas de *T. cruzi* desarrollan alteraciones electrofisiológicas cardíacas representativas de la enfermedad de Chagas (Eickhoff et al., 2010). En este sentido, las personas que provienen de áreas endémicas están expuestas a infecciones repetidas con *T. cruzi*; estudios previos en modelos murinos han mostrado que infecciones múltiples llevan a empeorar la reacción inflamatoria (Bustamante et al., 2002, 2003, 2004; Andrade et al., 2006) y sus consecuencias inmunopatológicas (da Silva Guerreiro et al., 2015). Tomando en cuenta la hipótesis de que la reinfección con cepas que difieren en sus bases genéticas puede tener efectos

significativos en el desarrollo de la patología, desarrollamos un modelo de infección mixta con diferentes cepas de *T. cruzi*.

Para este modelo, ratones BALB/c fueron infectados con 1×10^5 tripomastigotes sanguíneos del clon de baja virulencia K98. Transcurridas 6 semanas, que corresponden a la meseta de parasitemia de esta cepa, los ratones fueron re-infectados con 100 tripomastigotes sanguíneos de la cepa de alta virulencia, RA, como se muestra en la Figura 17.

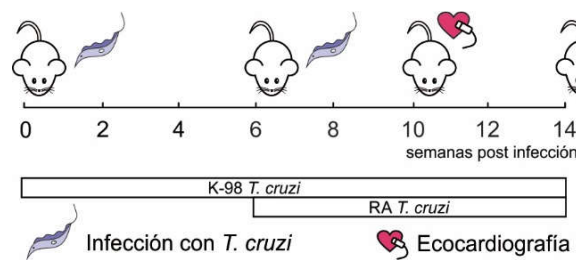


Figura 17. Modelo experimental de infección mixta con dos cepas de *Trypanosoma cruzi*. Ratones BALB/c fueron infectados con 1×10^5 tripomastigotes del clon K98 de *T. cruzi*. A las 6 semanas, los ratones se re-infectaron con 100 tripomastigotes de la cepa RA de *T. cruzi*.

La parasitemia fue detectable por microhematocrito desde las 3 semanas postinfección (s.p.i) y pudo ser medida por el método de Pizzi a las 4 s.p.i, aumentando hasta las 6 s.p.i. A partir de ese momento, la parasitemia decae hasta las 10 s.p.i, manteniéndose estable hasta el fin del experimento (14 s.p.i) (Figura 18).

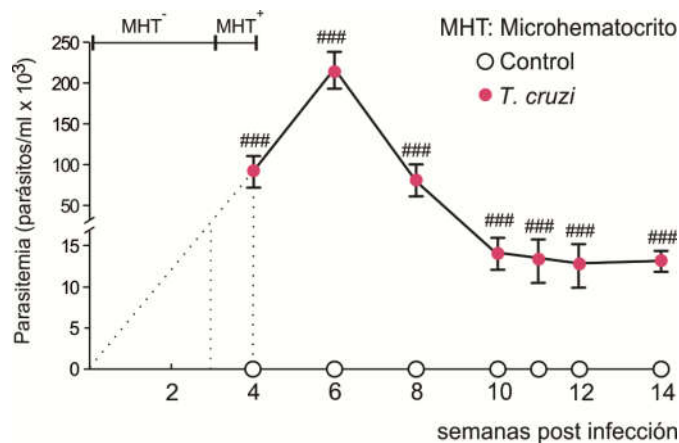


Figura 18. Curva de parasitemia de ratones con infección mixta con *Trypanosoma cruzi*. La parasitemia (parásitos/mL x 10^3) fue detectada en ratones infectados. La misma se evaluó mediante microhematocrito hasta las cuatro semanas post infección, y luego con el método de Pizzi modificado por Brenner. Los resultados expresan la media de 3 experimentos independientes (7 ratones / grupo) \pm Error estándar. ###P < 0,0001 vs. células control.

Esta curva de parasitemia es consistente con lo observado en las infecciones crónicas con *T. cruzi*. Asimismo, se evaluó el parasitismo cardíaco al finalizar el experimento y se detectaron parásitos a las 14 s.p.i, mediante qPCR (Tabla 2).

	<i>T. cruzi</i>
Parásitos equivalentes cada 50 ng de ADNg total ($\times 10^6$)	2,55 \pm 0,18

Tabla 2. Evaluación del parasitismo cardíaco en ratones con infección mixta con *Trypanosoma cruzi*.

La carga parasitaria en el corazón de los ratones fue detectada por qPCR a las 14 semanas post infección. Los resultados expresan la media de 3 experimentos independientes (7 ratones / grupo) \pm Error estándar.

Dado que ha sido demostrado que existe una correlación positiva entre el aumento del Diámetro de Fin de Diástole del Ventrículo Izquierdo (DDVI) con pérdida de fracción de eyección y la mortalidad de los pacientes con Enfermedad de Chagas (Rassi et al., 2006), nos pareció importante evaluar dichos parámetros en nuestro modelo. Para ello, se evaluó la función ventricular por ecocardiografía Doppler (en Modo-M), en la que se pueden observar componentes del corazón en una dimensión, a las 10 s.p.i.

En primer lugar, se obtuvieron los diámetros de fin de diástole (DSVI) y de fin de diástole (DDVI) del ventrículo izquierdo, y estos se vieron aumentados significativamente en ratones infectados con *T. cruzi* (Figura 19). Estos resultados son consistentes con una dilatación ventricular izquierda.

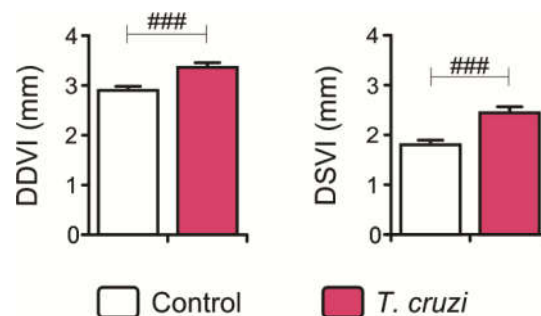


Figura 19. Medición de los diámetros de fin de sístole y diástole del ventrículo izquierdo de ratones infectados con *Trypanosoma cruzi*. El diámetro de fin de diástole (DDVI) y de fin de sístole (DSVI) del ventrículo izquierdo fueron evaluados por ecocardiografía, a las 10 semanas post infección. Los resultados expresan la media de 3 experimentos independientes (7 ratones /grupo) \pm Error estándar. ###P<0,0001 vs. ratones control.

A partir de estos valores, se calcularon la Fracción de Eyección y de Acortamiento como estimadores de la contractilidad miocárdica. Pudimos observar que los ratones con infección mixta presentan una pérdida de la fracción eyección, y de la fracción de acortamiento. Estos resultados evidencian una disfunción sistólica con pérdida de contractilidad, que puede estar producida por un engrosamiento de la pared del ventrículo (Figura 20).

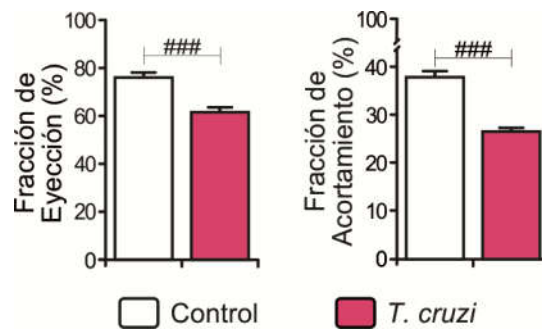


Figura 20. Evaluación de la función sistólica en la infección mixta con *Trypanosoma cruzi*. La fracción de eyección y acortamiento fue evaluada por ecocardiografía a las 10 semanas post infección. Los resultados expresan la media de 3 experimentos independientes (7 ratones / grupo) \pm Error estándar. ###P<0,0001 vs. ratones control.

La función ventricular diastólica fue evaluada a través del tiempo de relajación isovolumétrica (TRIV), mediante ecocardiografía *Doppler*. En la Figura 21 podemos observar que el TRIV fue prolongado en los ratones infectados, evidenciando anomalías en la relajación, que conducirían a una disfunción diastólica.

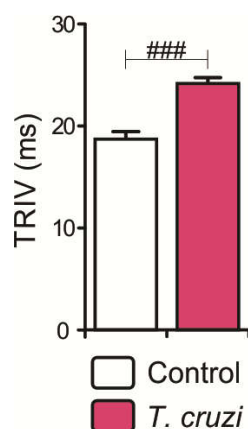


Figura 21. Evaluación de la función diastólica en la infección mixta con *Trypanosoma cruzi*. El tiempo de relajación isovolumétrica (TRIV) fue evaluado por ecocardiografía *Doppler* a las 10 semanas post infección. Los resultados expresan la media de 3 experimentos independientes (7 ratones / grupo) \pm Error estándar. ms= milisegundo. ###P<0,0001 vs. ratones control.

Evaluación del efecto del tratamiento conjunto sobre la disfunción ventricular y el parasitismo tisular.

El modelo de infección descrito evidencia disfunción ventricular, tanto sistólica como diastólica, y se asemeja a lo que ocurre en los pacientes con enfermedad de Chagas crónica. En primer lugar, nos propusimos determinar el efecto de bajas dosis de Bzl sobre la parasitemia y el parasitismo tisular en este modelo de infección.

Con este objetivo, los ratones fueron tratados por un período de dos semanas con Bzl 25 mg/Kg/día. La parasitemia se evaluó mediante el método de Pizzi, y cuando esta fue indetectable, se determinó la presencia del parásito mediante el método de microhematocrito. La Figura 22 muestra que a partir de las 12 s.p.i (y luego de 2 semanas de tratamiento), Bzl 25 mg/Kg/día fue efectivo ya que la parasitemia fue indetectable por ambos métodos.

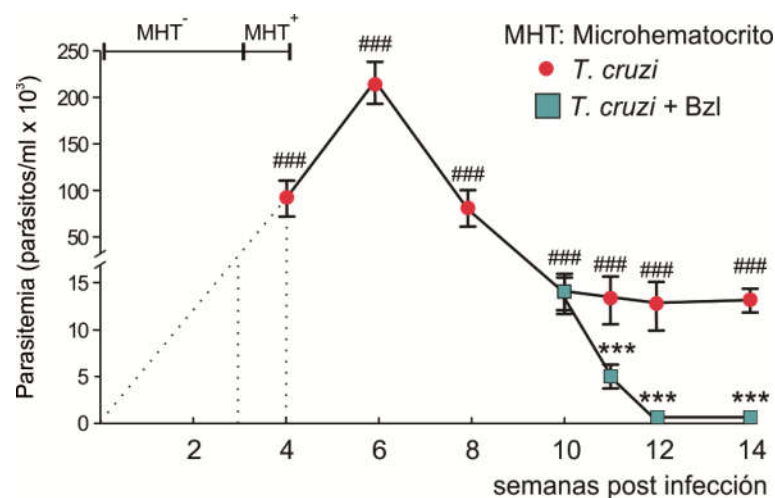


Figura 22. Benznidazol elimina la parasitemia en ratones infectados con *Trypanosoma cruzi*. La parasitemia (parásitos/mL x 10³) fue detectada en ratones infectados o infectados y tratados con benznidazol (Bzl 25 mg/Kg/día). Se cuantificó la cantidad de parásitos mediante el método de Pizzi modificado por Brenner, y la presencia de parásitos en sangre se evaluó mediante microhematocrito. Los resultados expresan la media de 3 experimentos independientes (7 ratones / grupo) ± Error estándar. ***P < 0,0001 vs. ratones infectados con *T. cruzi*. ###P < 0,0001, vs. ratones control.

A las 14 s.p.i se realizaron ensayos de qPCR para evaluar el parasitismo tisular y se constató que los parásitos fueron eliminados de los corazones de los ratones infectados y tratados con Bzl 25 mg/Kg/día (Tabla 3).

	<i>T. cruzi</i>	<i>T. cruzi</i> + Bzl
Parásitos equivalentes cada 50 ng de ADNg total (x 10 ⁶)	2,55 ± 0,18	ND ***

Tabla 3. Benznidazol elimina el parasitismo cardíaco en ratones infectados con *Trypanosoma cruzi*.

La carga parasitaria del corazón fue detectada por qPCR en ratones infectados o ratones infectados y tratados con benznidazol (Bzl 25 mg/kg/día) a las 14 semanas post infección. ND= No Detectable. Los resultados expresan la media de 3 experimentos independientes (7 ratones / grupo) ± Error estándar. ***P < 0,0001 vs. ratones infectados con *T. cruzi*.

Dado que Bzl 25 mg/Kg/día elimina los parásitos en sangre y en el corazón, quisimos evaluar si esto se relaciona con una mejora en la patología cardíaca descrita. Sin embargo, los estudios ecocardiográficos no muestran diferencias significativas en la fracción de eyección y de acortamiento entre los ratones infectados, tratados y no tratados con Bzl 25 mg/Kg/día (Figura 23).

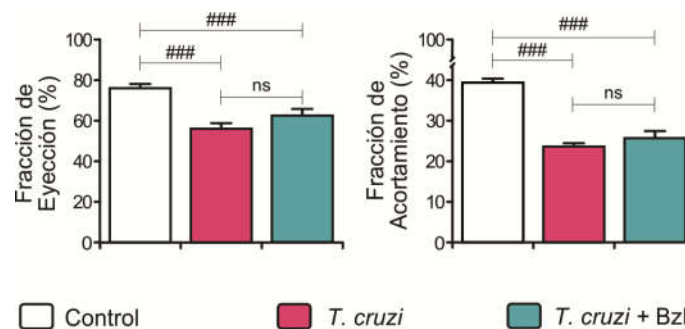


Figura 23. Benznidazol no mejora la disfunción ventricular producida por la infección mixta con *Trypanosoma cruzi*. La fracción de eyección y acortamiento fue evaluada por ecocardiografía. Los resultados expresan la media de 3 experimentos independientes (7 ratones / grupo) ± Error estándar. ns= no significativo, ###P<0,0001 vs. ratones control.

Dado que los ligandos de PPAR han emergido como reguladores de la inflamación y función cardíaca, quisimos evaluar si el tratamiento con fenofibrato (Fen), un ligando sintético de PPAR α , podía ser un abordaje racional para mejorar alteraciones cardíacas de origen inflamatorio. Primero, en nuestro modelo experimental, evaluamos la expresión del receptor PPAR α en ratones infectados con *T. cruzi*. Determinamos que los niveles de ARNm de PPAR α fueron 5 veces más altos en ratones infectados que en los no infectados, medidos por RT-qPCR. Además, constatamos un aumento en la expresión proteica de PPAR α por Wb (Figura 24).

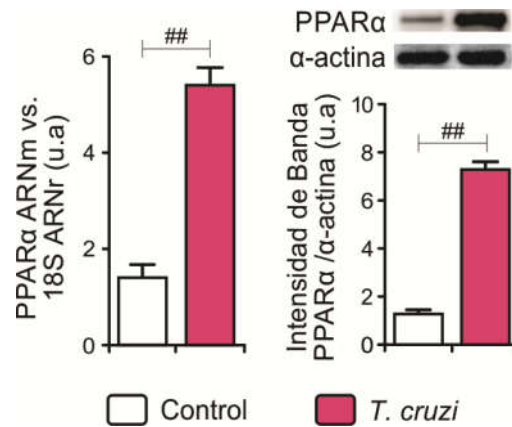


Figura 24. La infección con *Trypanosoma cruzi* aumenta la expresión del receptor PPARα. Los niveles de ARNm y proteínas de PPARα fueron determinados en corazones de ratones controles o infectados (14 semanas post infección), por RT-qPCR y Western blot con cebadores y anticuerpos específicos, respectivamente. Los resultados de RT-qPCR fueron normalizados contra ARNr 18S. Los niveles de proteínas fueron normalizados contra α-actina. Los resultados expresan la media de 3 experimentos independientes (7 ratones / grupo) ± Error estándar. ## P < 0,001 vs. ratones control.

Dado el aumento de la expresión de PPARα en los ratones infectados, el tratamiento con un agonista que active este receptor, podría ser útil para mejorar la disfunción ventricular.

Para evaluar la dosis óptima de Fen, agonista PPARα, realizamos un estudio dosis-respuesta en ratones infectados con ambas cepas de *T. cruzi*. A partir de las 10 s.p.i, fueron ensayadas distintas dosis de Fen, por 4 semanas (Figura 25).

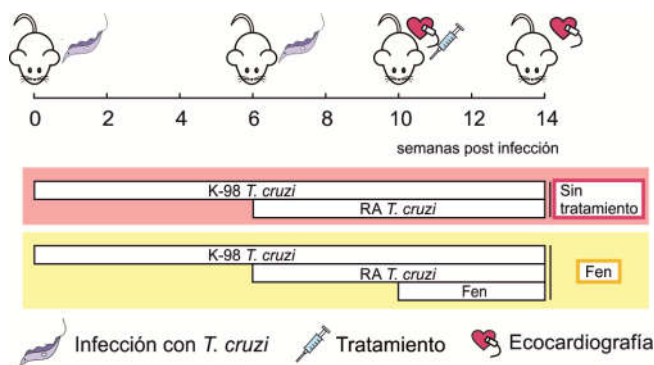


Figura 25. Modelo experimental de reinfección y tratamiento. Ratones BALB/c fueron infectados con 1×10^5 tripomastigotes del clon K98 de *T. cruzi*. A las 6 s.p.i, se re infectaron con 100 tripomastigotes de la cepa RA de *T. cruzi*. A las 10 s.p.i los ratones infectados fueron tratados con 100, 200 o 300 mg/Kg/día de fenofibrato (Fen) por 30 días consecutivos.

Pudimos comprobar que Fen, a partir de 100 mg/kg/día, restaura la fracción de eyección y de acortamiento en ratones infectados con *T. cruzi* (Figura 26).

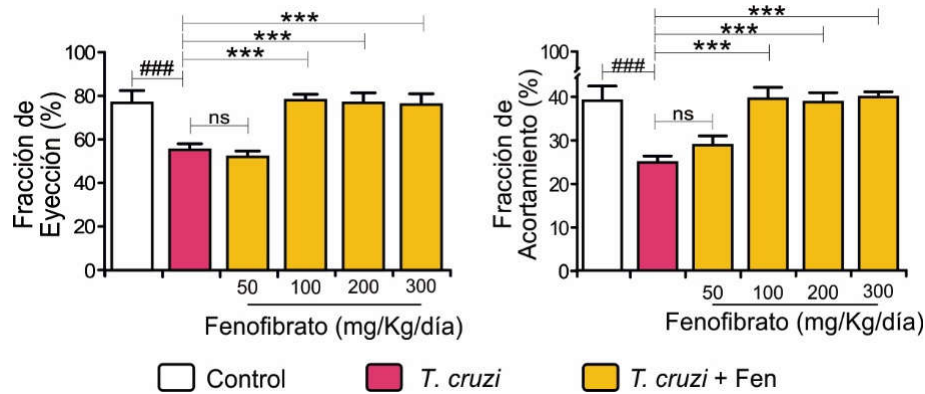


Figura 26. Evaluación de la dosis mínima de fenofibrato que revierte la disfunción sistólica en ratones infectados con *Trypanosoma cruzi*. La fracción de eyección y acortamiento fue evaluada por ecocardiografía en los ratones infectados o infectados y tratados con 100, 200 o 300 mg/Kg/día de fenofibrato (Fen). Los resultados expresan la media de 3 experimentos independientes (7 ratones / grupo) ± Error estándar. ns= no significativo, ***P < 0,0001 vs. ratones infectados con *T. cruzi*. ### P<0,0001 vs. ratones control.

Observamos que la dosis óptima de Fen (100mg/kg/día) no modifica la parasitemia ni el parasitismo tisular (Tabla 4).

	<i>T. cruzi</i>	<i>T. cruzi</i> + Fen
Parasitemia (parásitos/ml x 10³)	11,75 ± 1,77	11,93 ± 1,95 ^{ns}
Parásitos equivalentes cada 50 ng de ADNg total (x 10⁶)	2,55 ± 0,18	2,46 ± 0,07 ^{ns}

Tabla 4. Fenofibrato no modifica la parasitemia ni el parasitismo cardíaco en ratones infectados con *Trypanosoma cruzi*. La parasitemia (parásitos/mL x 10³) fue detectada mediante el método de Pizzi modificado por Brenner, y la carga parasitaria del corazón fue detectada por qPCR, en ratones infectados o ratones infectados y tratados con 100 mg/Kg/día de Fen, a las 14 semanas post infección. Los resultados expresan la media de 3 experimentos independientes (7 ratones / grupo) ± Error estándar. ns= no significativo.

Con estos resultados, nos planteamos evaluar un tratamiento conjunto con Fen y Bzl, en el cual se combinen los efectos cardioprotector y parasiticida, respectivamente. Con el objetivo de comprobar los efectos del tratamiento combinado de Bzl y Fen en la enfermedad de Chagas experimental, ratones con infección mixta fueron tratados a partir de las 10 s.p.i con 25 mg/kg/día de Bzl durante 15 días. Paralelamente, se inició un tratamiento con 100mg/kg/día de Fen durante 30 días (Figura 27).

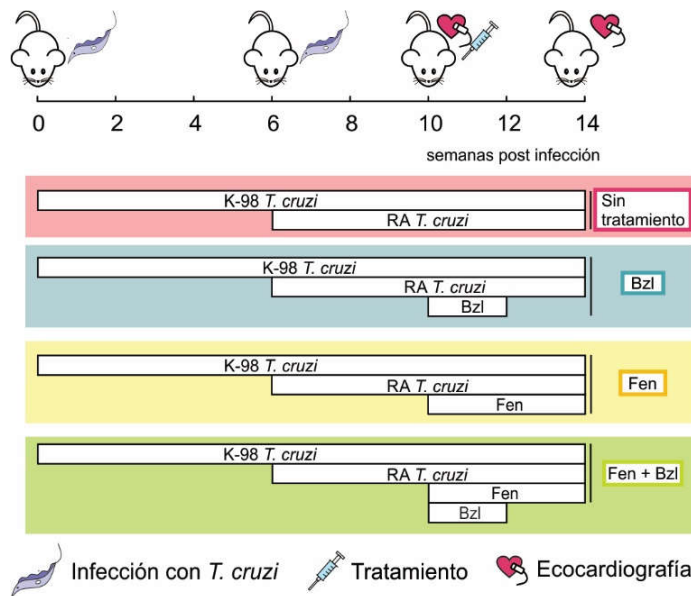


Figura 27. Modelo experimental de infección mixta y tratamientos.

Ratones BALB/c fueron infectados con 1×10^5 tripomastigotes del clon K98 de *T. cruzi*. A las 6 s.p.i, se re infectaron con 100 tripomastigotes de la cepa RA de *T. cruzi*. Los ratones infectados fueron tratados con 25 mg/Kg/día de benznidazol (Bzl) por 15 días consecutivos, con 100 mg/Kg/día de fenofibrato (Fen) por 30 días consecutivos, o con la combinación.

Los resultados del tratamiento conjunto con Bzl y Fen muestran la efectividad del mismo para revertir la disfunción ventricular izquierda producida por la infección.

En la Figura 28 podemos observar que se restituye el diámetro de fin de sístole del ventrículo izquierdo, lo que resulta en la normalización de la fracción de eyección y de acortamiento.

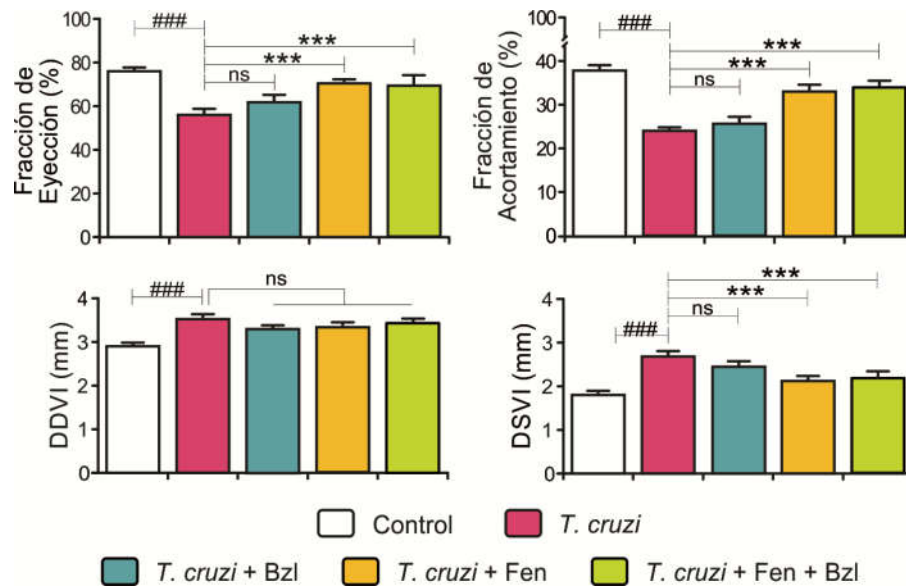


Figura 28. Fenofibrato revierte la disfunción sistólica producida por la infección con *Trypanosoma cruzi*. Los ratones fueron sometidos al esquema de infección mixta y tratados con 25 mg/Kg/día de Benznidazol (Bzl) durante 15 días, y/o con 100 mg/Kg/día de Fenofibrato (Fen) durante 30 días. La fracción de eyección, de acortamiento, el diámetro de fin de diástole (DDVI) y de fin de sístole (DSVI) del ventrículo izquierdo fueron evaluados por ecocardiografía. Los resultados expresan la media de 3 experimentos independientes (7 ratones / grupo) \pm Error estándar. ns= No significativo. ***P < 0,0001 vs. ratones infectados con *T. cruzi*. ### P<0,0001 vs. ratones control.

Asimismo, se observa una recuperación de la función diastólica, ya que se revierte la prolongación del Tiempo de Relajación Isovolumétrico (Figura 29). Cabe destacar que no existen diferencias significativas entre el tratamiento con Fen y el tratamiento conjunto, evidenciando que Bzl no afecta el efecto cardioprotector de Fen.

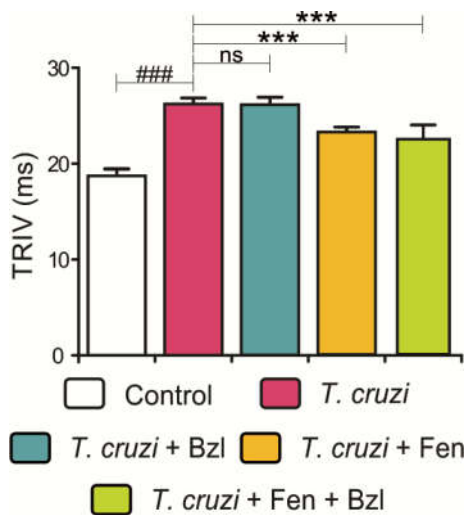


Figura 29. Fenofibrato revierte la disfunción diastólica producida por la infección con *Trypanosoma cruzi*. Los ratones fueron sometidos al esquema de infección mixta y tratados con 25 mg/Kg/día de Benznidazol (Bzl) durante 15 días, y/o con 100 mg/Kg/día de Fenofibrato (Fen) durante 30 días. El tiempo de relajación isovolumétrica (TRIV) fue evaluado por ecocardiografía *Doppler*. Los resultados expresan la media de 3 experimentos independientes (7 ratones / grupo) ± Error estándar. ms= milisegundo. ns= No significativo. ***P<0,0001 vs. ratones infectados con *T. cruzi*. ### P<0,0001 vs. ratones control.

Por otra parte, pudimos demostrar que Bzl elimina los parásitos (tanto de la sangre como del tejido cardíaco), independientemente de la presencia de Fen (Tabla 5).

	<i>T. cruzi</i>	<i>T. cruzi</i> + Fen	<i>T. cruzi</i> + Bzl + Fen
Parasitemia (parásitos/ml x 10³)	11,75 ± 1,77	11,93 ± 1,95 ^{ns}	ND ^{***}
Parásitos equivalentes cada 50 ng de ADNg total (x 10⁶)	2,55 ± 0,18	2,46 ± 0,07 ^{ns}	ND ^{***}

Tabla 5. Fenofibrato no modifica la parasitemia, y no modifica el efecto parasiticida de benznidazol.

Los ratones fueron sometidos al esquema de infección mixta y tratados con 25 mg/Kg/día de Benznidazol (Bzl) durante 15 días, y/o con 100 mg/Kg/día de Fenofibrato (Fen) durante 30 días. La parasitemia (parásitos/mL x 10³) fue detectada mediante el método de Pizzi modificado por Brenner, y la carga parasitaria del corazón fue detectada por qPCR, en ratones infectados o ratones infectados y tratados a las 14 semanas post infección. Los resultados expresan la media de 3 experimentos independientes (7 ratones / grupo) ± Error estándar. ND= No detectable. ns= no significativo, ***P < 0,0001 vs. ratones infectados con *T. cruzi*.

Evaluación del efecto del tratamiento conjunto sobre la respuesta inflamatoria cardíaca.

Dado que ha sido demostrado que la patología cardíaca en la enfermedad de Chagas tiene un fuerte componente inflamatorio (Machado et al., 2013; Trachtenberg et al., 2017) y que los agonistas PPAR α , como el Fen, poseen actividad antiinflamatoria, nos propusimos evaluar su efecto en la respuesta inflamatoria e injuria cardíaca, con el fin de estudiar los mecanismos de acción involucrados en el efecto cardioprotector observado.

Con el objetivo de determinar la presencia de infiltrado inflamatorio en el corazón, se realizaron cortes histológicos y una tinción con Hematoxilina-Eosina. Pudimos observar que la infección mixta provocó una reacción inflamatoria difusa en el corazón a las 14 s.p.i., y el tratamiento con Fen la redujo a infiltrados focales en menos del 10% del área del ventrículo (Figura 30). Asimismo, en los cortes se puede observar que el tratamiento combinado eliminó completamente los infiltrados de células mononucleares.

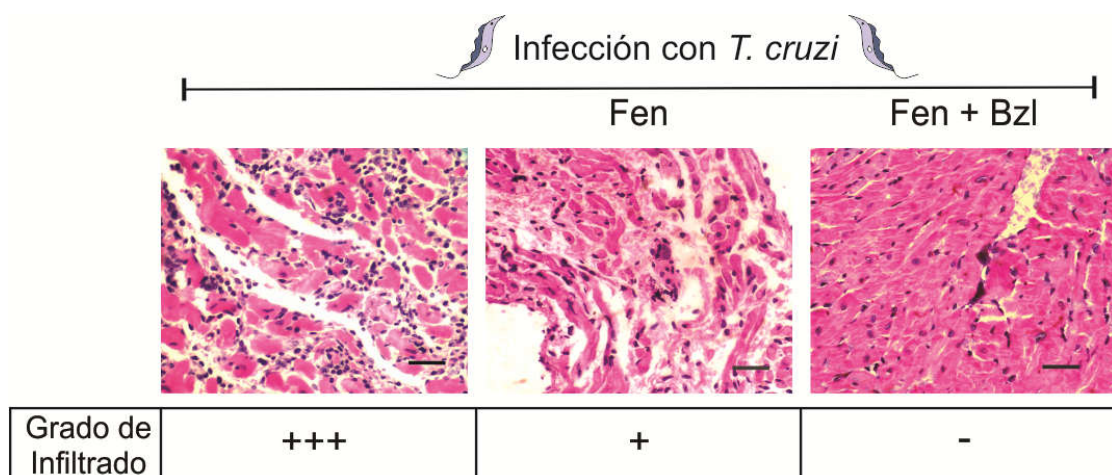


Figura 30. Fenofibrato atenúa la respuesta inflamatoria en ratones infectados con *Trypanosoma cruzi*.

Los ratones fueron sometidos al esquema de infección mixta y tratados con 25 mg/Kg/día de Benznidazol (Bzl) durante 15 días, y/o con 100 mg/Kg/día de Fenofibrato (Fen) durante 30 días. La reacción inflamatoria fue analizada en secciones histológicas de corazones de ratones infectados o infectados y tratados, a las 14 semanas post infección. Tinción con Hematoxilina-Eosina. Magnificación: 400x. Barra: 100 μ m. El grado de infiltrado se diferenció de manera cualitativa de la siguiente manera: (-) Sin infiltrado, (+) Infiltrados focales escasos que comprometen menos del 10% del área del ventrículo, (++) Infiltrados focales o espaciados que comprometen 10-25% del área del ventrículo (+++) Inflamación miocárdica difusa que incluye infiltrados coalescentes.

Para evaluar la injuria cardíaca producida por la infección, decidimos medir la actividad de la enzima creatina Kinasa (CK) en el suero de los ratones de los diferentes grupos experimentales. Podemos observar que el tratamiento con Fen reduce el daño cardíaco producido por la infección, y que el tratamiento conjunto mantiene este efecto (Figura 31).



Figura 31. Fenofibrato atenúa la injuria cardíaca producida por la infección con *Trypanosoma cruzi*. Los ratones fueron sometidos al esquema de infección mixta y tratados con 25 mg/Kg/día de Benznidazol (Bzl) durante 15 días, y/o con 100 mg/Kg/día de Fenofibrato (Fen) durante 30 días. La actividad de creatina kinasa (CK) en el suero de ratones infectados o infectados y tratados, fue determinada como un marcador de injuria cardíaca. Los resultados expresan la media de 3 experimentos independientes (7 ratones / grupo) \pm Error estándar. U/L= Unidades por litro. ***P < 0,0001 vs. ratones infectados con *T. cruzi*. ###P < 0,0001 vs. ratones control.

Para profundizar en el conocimiento del estado inflamatorio de los animales infectados y tratados, nos propusimos estudiar la expresión de diferentes mediadores, tanto a nivel transcripcional (niveles de ARNm) como traduccional (niveles de proteínas).

Como muestra la Figura 32, la expresión de ARNm de TNF- α e IL-6 aumentó significativamente en corazón de ratones infectados. Esto se correlaciona con liberación de dichas citoquinas al suero de los ratones. Asimismo, determinamos que Fen inhibió la expresión de ARNm y la liberación de ambas citoquinas y que Bzl no modificó este efecto.

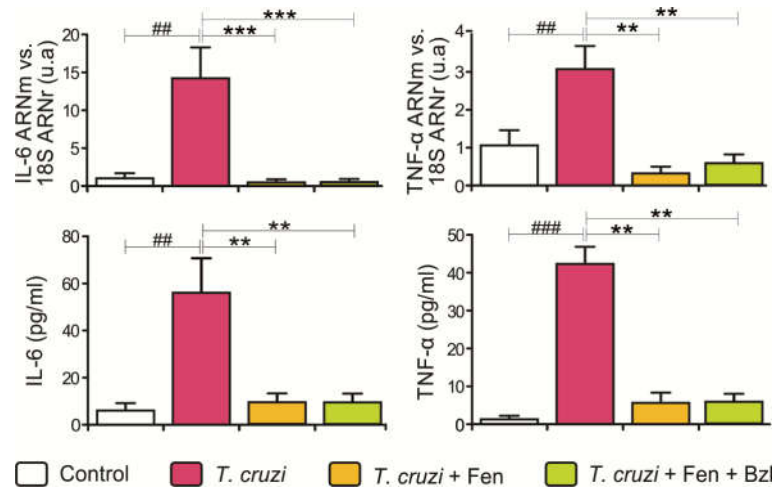


Figura 32. La expresión de citoquinas proinflamatorias son inhibidos por fenofibrato en corazones y suero de ratones infectados con *Trypanosoma cruzi*. Los ratones fueron sometidos al esquema de infección mixta y tratados con 25 mg/Kg/día de Benznidazol (Bzl) durante 15 días, y/o con 100 mg/Kg/día de Fenofibrato (Fen) durante 30 días. Los niveles de ARNm de IL-6 y TNF-α fueron analizados mediante RT-qPCR en corazones de ratones infectados o infectados y tratados. Los resultados de RT-qPCR fueron normalizados contra ARNr 18S. Los niveles de IL-6 y TNF-α en suero de ratones infectados o infectados y tratados, fueron evaluados por ELISA. Los resultados expresan la media de 3 experimentos independientes (7 ratones / grupo) ± Error estándar. **P < 0,001, ***P < 0,0001 vs. ratones infectados con *T. cruzi*. ## P<0,001, ### P<0,0001 vs. ratones control

Asimismo, Fen reduce la expresión de la enzima NOS2 (ARNm y proteína) aumentada por la infección, y Bzl no modifica este efecto (Figura 33).

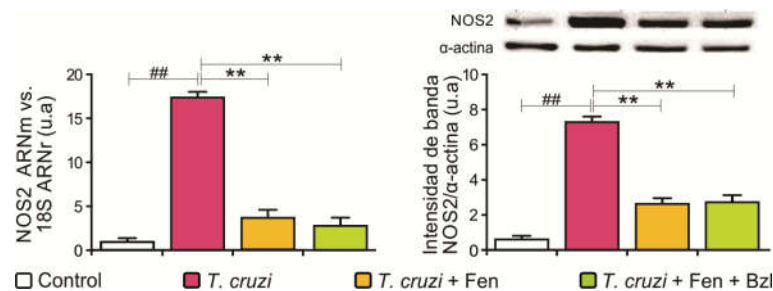


Figura 33. La expresión de NOS2 es inhibida por fenofibrato en corazones de ratones infectados con *Trypanosoma cruzi*. Los ratones fueron sometidos al esquema de infección mixta y tratados con 25 mg/Kg/día de Benznidazol (Bzl) durante 15 días, y/o con 100 mg/Kg/día de Fenofibrato (Fen) durante 30 días. Los niveles de ARNm de NOS2 y la expresión de la enzima NOS2 fueron determinados en corazones de ratones infectados o infectados y tratados, por RT-qPCR y Western blot con cebadores y anticuerpos específicos, respectivamente. Los resultados de RT-qPCR fueron normalizados contra ARNr 18S. Los niveles de proteínas fueron normalizados contra α-actina. Los resultados expresan la media de 3 experimentos independientes (7 ratones / grupo) ± Error estándar. **P < 0,001 vs. ratones infectados con *T. cruzi*. ## P < 0,001 vs. ratones control.

Evaluar el efecto del tratamiento conjunto sobre la fibrosis y la remodelación cardíaca en ratones infectados con *Trypanosoma cruzi*

Una de las causas de la pérdida de la contractilidad cardíaca es el aumento de la fibrosis (Mitelman et al., 2011). Por ello, nos resultaba de interés evaluar el efecto del tratamiento conjunto en la prevención de la fibrosis en los ratones infectados con *T. cruzi*. Para ello, se realizaron cortes histológicos y una coloración Rojo de Picrosirio. Se detectaron intensos depósitos de colágeno intersticial y perivascular en ratones infectados, consistentes con fibrosis reactiva. Podemos observar que el tratamiento conjunto elimina los depósitos de colágeno intersticiales y perivasculares (Figura 34).

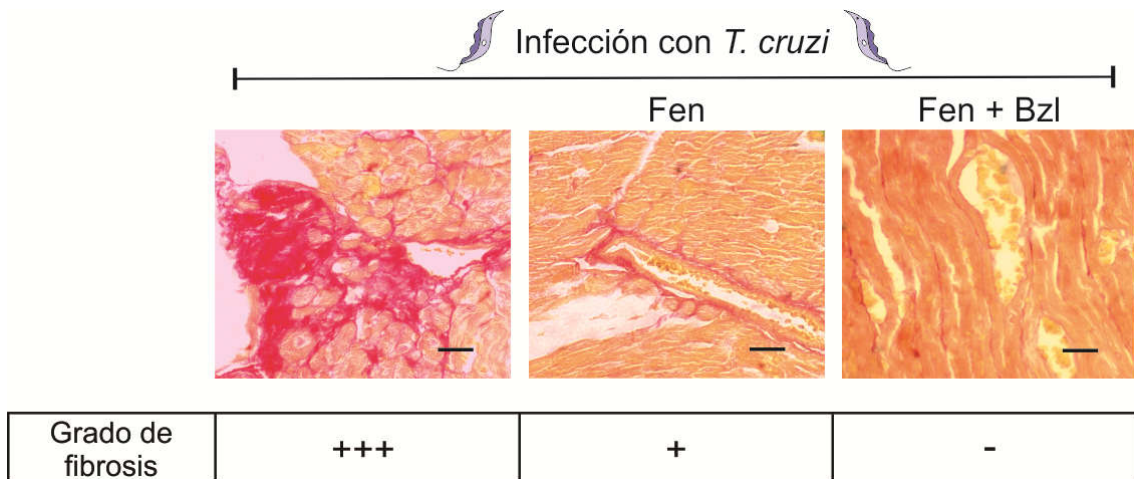


Figura 34. Fenofibrato atenúa la fibrosis cardíaca en ratones infectados con *Trypanosoma cruzi*. Los ratones fueron sometidos al esquema de infección mixta y tratados con 25 mg/Kg/día de Benznidazol (Bzl) durante 15 días, y/o con 100 mg/Kg/día de Fenofibrato (Fen) durante 30 días. La fibrosis fue analizada en secciones histológicas de corazones de ratones infectados o infectados y tratados, a las 14 semanas post infección. Tinción con Rojo de Picrosirio. Magnificación: 400x. Barra: 100 µm. Grado de fibrosis (% área fibrótica): (-) <1%, (+) 1-5%, (++) 5-10%, (+++) >10%.

Además, evaluamos la expresión del ARNm del factor de crecimiento de tejido conectivo (CTGF) mediante RT-qPCR y la expresión cardíaca de MMP-9 mediante Wb. Estos son dos parámetros que se encuentran elevados en presencia de fibrosis. Pudimos demostrar que el tratamiento con Fen disminuye significativamente el aumento de estos mediadores de remodelación de tejido conectivo producido por la infección, y que el Bzl no modifica este efecto (Figura 35).

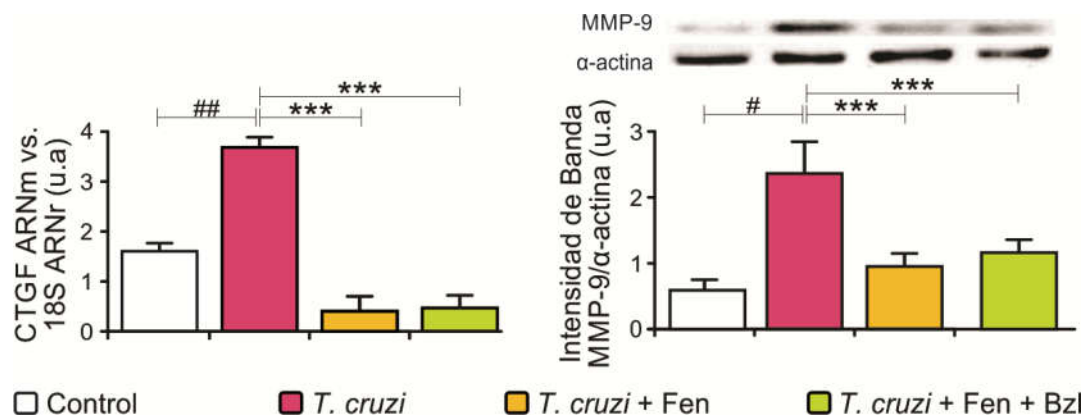


Figura 35. La expresión de marcadores de remodelación cardíaca es inhibida por Fenofibrato en ratones de corazones infectados con *Trypanosoma cruzi*. Los ratones fueron sometidos al esquema de infección mixta y tratados con 25 mg/Kg/día de Benznidazol (Bzl) durante 15 días, y/o con 100 mg/Kg/día de Fenofibrato (Fen) durante 30 días. Los niveles de ARNm del Factor de Crecimiento de Tejido Conectivo (CTGF) y la expresión de la enzima metaloproteasa 9 (MMP-9) fueron determinados en corazones de ratones infectados o infectados y tratados, por RT-qPCR y Western blot con cebadores y anticuerpos específicos, respectivamente. Los resultados de RT-qPCR fueron normalizados contra ARNr 18S. Los niveles de proteínas fueron normalizados contra α-actina. Los resultados expresan la media de 3 experimentos independientes (7 ratones / grupo) ± Error estándar. ***P < 0,0001 vs. ratones infectados con *T. cruzi*. # P < 0,05, ## P < 0,001 vs. ratones control.

Participación de la vía NF-κB en los efectos ejercidos por fenofibrato, en cardiomiocitos infectados con *Trypanosoma cruzi*.

Una vez determinado que el tratamiento con Fen mejora la función ventricular e inhibe la expresión de mediadores proinflamatorios y profibróticos, nos propusimos estudiar si ejerce su efecto a través de su receptor. Para ello, cardiomiocitos neonatales de ratón fueron aislados y tratados con Fen 30 minutos previos a la infección con la cepa RA de *T. cruzi* (en relación 5:1, parásito:célula).

En primer lugar, evaluamos la concentración mínima de Fen que inhiba la respuesta inflamatoria producida por la infección *in vitro*, a través de la medición de la expresión de la enzima NOS2. Determinamos que 100μM es la concentración de Fen óptima para inhibir la expresión de esta enzima luego de la infección (Figura 36)

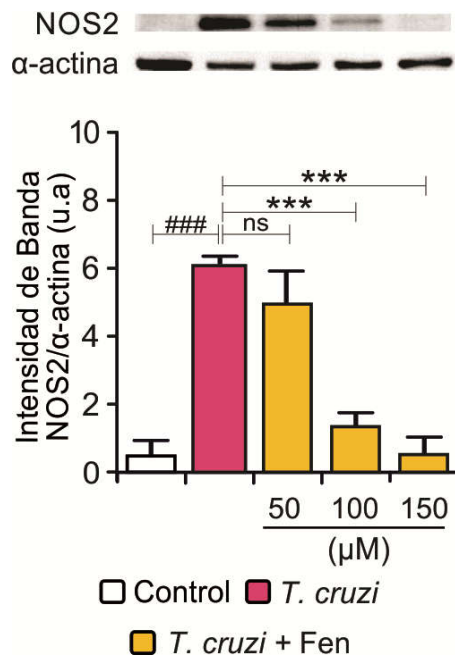


Figura 36. Evaluación de la concentración de fenofibrato que inhiba la expresión de NOS2 en cardiomiocitos infectados con *Trypanosoma cruzi*. Cardiomiocitos fueron tratados con diferentes concentraciones de fenofibrato (Fen) 30 minutos previos a la infección con tripomastigotes de la cepa RA de *T. cruzi*, en relación 5:1 (parásito: célula) por 48h. La expresión de la enzima NOS2 fue determinada por Western blot con anticuerpos específicos y normalizado con α -actina. Los resultados expresan la media de 3 experimentos independientes (3 réplicas / tratamiento) \pm Error estándar. ns= no significativo. *** $P < 0,0001$ vs. células infectadas con *T. cruzi* sin tratar. ### $P < 0,0001$ vs. Células control.

Bajo estas condiciones, determinamos que el tratamiento con Fen inhibió la expresión de NOS2 inducida por la infección y la consecuente liberación de NO al sobrenadante celular. Además, para evaluar la participación de PPAR α en los efectos de Fen, células infectadas fueron pre-tratadas con MK886, un potente inhibidor no competitivo de PPAR α . En presencia de MK886, Fen inhibió parcialmente la expresión de NOS2 y la liberación de NO (Figura 37). Estos resultados sugieren que Fen está ejerciendo sus efectos, al menos en parte, a través de su receptor.

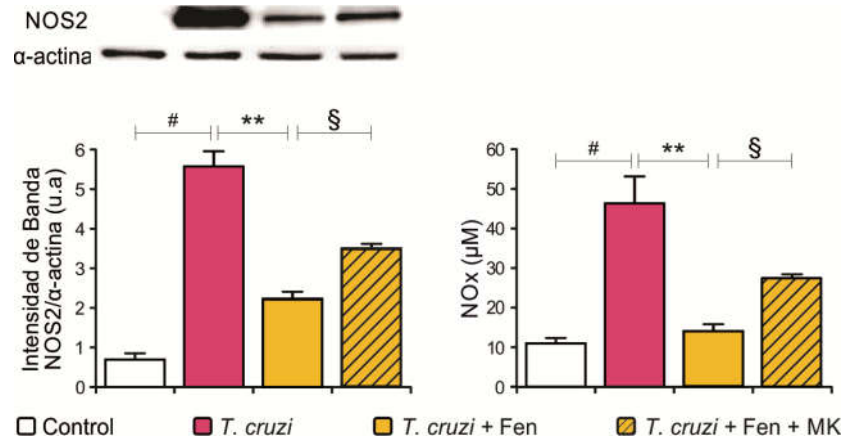


Figura 37. Participación de PPAR α en los efectos de fenofibrato en cardiomiocitos infectados con *T. cruzi*. Cardiomiocitos fueron pre-tratados 10 μ M MK886, un antagonista de PPAR α , y tratados con 100 μ M de fenofibrato (Fen). Luego de 30 minutos, los cardiomiocitos fueron infectados con *T. cruzi* por 48h. La expresión de la enzima NOS2 fue determinada por Western blot con anticuerpos específicos y normalizado con α -actina. Los niveles de NO fueron cuantificados por el método de Griess en sobrenadantes de cultivo. Los resultados expresan la media de 3 experimentos independientes (3 réplicas / tratamiento) \pm Error estándar. **P<0,001 vs. células infectadas con *T. cruzi* sin tratar. #P<0,05 vs. células control. § P<0,05 vs. células infectadas con *T. cruzi* tratadas con Fen.

Ha sido reportado que Fen inhibe la vía NF- κ B en diferentes modelos experimentales (Shen et al., 2014; Zuo et al., 2015; Garcia-Ramírez et al., 2016). Es por ello que quisimos determinar si esta vía está involucrada en los efectos de Fen. En la Figura 38 podemos observar que la infección con *T. cruzi* produce una activación de la vía NF- κ B, evidenciada por la degradación citosólica del inhibidor I κ B α a los 30 minutos. Además, observamos que en presencia de Fen el inhibidor I κ B α no desaparece del citosol, indicando la inhibición de esta vía de señalización.

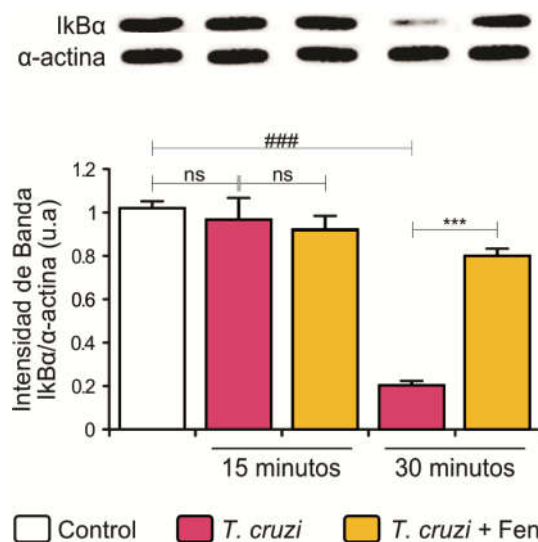


Figura 17. La vía NF κ B participa en el efecto de fenofibrato. Cardiomiocitos fueron tratados con 100 μ M de fenofibrato (Fen) 30 minutos previos a la infección con *T. cruzi*, en relación 5:1 (parásito : célula), por 15 o 30 min. La expresión citosólica de I κ B α fue determinada mediante Western blot utilizando anticuerpos específicos. Los niveles de proteínas fueron normalizados contra α -actina. ***P<0,0001 vs. células infectadas con *T. cruzi* sin tratar. ###P < 0,0001 vs. Células control.

DISCUSIÓN

*“El motor de la ciencia es la curiosidad con las preguntas constantes:
‘¿Y eso cómo es?’, ‘¿en qué consiste?’, ‘¿cómo funciona?’
Y lo más fascinante es que cada respuesta trae consigo nuevas
preguntas.*

*En eso los científicos le llevamos ventajas a los exploradores:
cuando creemos haber llegado a la meta anhelada,
nos damos cuenta de que lo más interesante
es que hemos planteado nuevos problemas para explorar”*

César Milstein. 2000

La fase aguda de la enfermedad de Chagas tiene lugar durante las primeras semanas o meses de infección, y puede presentarse de manera asintomática. Si no es tratada a tiempo, puede evolucionar a una patología crónica, dando lugar al desarrollo de alteraciones cardíacas sintomáticas causando una alta morbilidad con gran impacto económico y social (Benziger et al., 2017). El tratamiento con Bzl puede inducir efectos adversos de variada severidad en pacientes adultos, y esto representa la mayor limitante de su uso clínico, dado el requerimiento en estos casos de interrupción del mismo (Noguerado-Mellado et al., 2016). Por lo tanto, encontrar opciones para mejorar la efectividad de Bzl y reducir sus efectos adversos es muy deseable, si consideramos que es el único tratamiento antiparasitario disponible en muchos países. En este sentido, en la primera parte del trabajo, nos propusimos evaluar dosis de Bzl más bajas que las usadas actualmente para el tratamiento de la enfermedad de Chagas experimental, con el objetivo de determinar la dosis efectiva mínima. Este estudio fue realizado usando la cepa RA de *T. cruzi*, que pertenece a la UDT VI (Zingales et al., 2009). Esta cepa es pantrópica y reticulotrópica, y es altamente virulenta y letal para el ratón si la recibe como primoinfección (Mirkin et al., 1994). La alta parasitemia que se detecta en los días siguientes a la infección es una característica deseada del modelo, ya que nos permite evaluar la efectividad del tratamiento parasiticida con Bzl a las dosis ensayadas. En este sentido, un inóculo de 500 parásitos por vía intraperitoneal, produce 100% de mortalidad en ratones BALB/c de 8 semanas de edad, en un corto período de tiempo.

El hecho de que estos ensayos se hayan realizado utilizando una sola cepa de parásitos, que pertenece a una UDT particular, podría plantear problemas con respecto a la eficacia de dicho tratamiento en vista de la posible aparición de resistencia al Bzl en diferentes cepas. Sin embargo, hasta el momento no se han encontrado evidencias de la asociación entre una UDT particular y la resistencia a Bzl, ya que cada UDT puede incluir poblaciones de *T. cruzi* de variada susceptibilidad (Gruendling et al., 2015). En este modelo de infección y tratamiento con bajas dosis, no evidenciamos la aparición de resistencia del parásito, dado que no se detectan parásitos en sangre ni en el corazón, al menos hasta 20 días después de la finalización del tratamiento.

En este trabajo de tesis demostramos, por primera vez, que Bzl tiene propiedades parasiticidas *in vivo* e *in vitro*, a dosis más bajas que las reportadas previamente para cepas de *T. cruzi* altamente virulentas. Nuestros resultados muestran que, en ratones infectados con la cepa RA de *T. cruzi*, el tratamiento con 25 mg/kg/día es tan efectivo como el de la dosis terapéutica reportada en la bibliografía (100 mg/kg/día) para curar la enfermedad de Chagas experimental (de Andrade et al., 1996; Guedes et al., 2011; Molina-Berríos et al., 2013). Esto se vio reflejado en el peso corporal y la tasa de supervivencia luego del tratamiento, dado que no se observan diferencias significativas en ambos parámetros entre los grupos experimentales usando las dosis indicadas. Observamos que los ratones tratados con 25 mg/kg/día por 30 días y controlados durante 20 días luego del fin del tratamiento, permanecen con parásitos indetectables en sangre (por microhematocrito), y en corazón (qPCR) tal como ocurre en el esquema de tratamiento estándar (100 mg/kg/día por 30 días). Estos resultados confirman la efectividad del tratamiento con la dosis baja de Bzl y la sensibilidad de la técnica qPCR utilizada que supera a los exámenes serológicos y sanguíneos tal como es afirmado por Martins et al., (2008).

El tratamiento con una dosis baja de Bzl también fue capaz de inhibir la expresión de mediadores proinflamatorios y la persistencia de los infiltrados inflamatorios tisulares. En este trabajo mostramos que la infección con *T. cruzi* estimula la respuesta inflamatoria, en términos de infiltrados celulares y la expresión de ARNm de IL-1 β e IL-6 y producción de la Óxido Nítrico Sintasa 2 (NOS2) en el corazón del ratón. Estos resultados coinciden con los descritos previamente por nuestro grupo en ratones infectados con cepas de *T. cruzi* de diferente letalidad (Penas et al., 2013) y en cultivos de células cardíacas de ratones neonatales infectadas con *T. cruzi* (Hovsepian et al., 2011). La expresión de genes inflamatorios en el corazón juega un rol esencial en la disfunción. En este sentido, ha sido demostrado que NOS2 está involucrado en la patogénesis de enfermedades cardíacas (Qian et al., 2001; Goren et al., 2004; Oller et al., 2017). Si bien ha sido descrito que el Óxido Nítrico (NO) es un mediador tripanocida en la enfermedad de Chagas, (Muñoz-Fernández et al., 1992; PETRAY et al., 1994; Fichera et al., 2004), también se ha propuesto que la liberación excesiva de NO por células inflamatorias, puede derivar en falla cardíaca (Massion et

al., 2003). En este estudio, reportamos por primera vez que una dosis baja de Bzl (25 mg/kg/día) inhibe la expresión de citoquinas proinflamatorias y NOS2 (y por lo tanto la producción de NO), en un modelo murino experimental de infección con una cepa de *T. cruzi* de alta letalidad. Asimismo, observamos que dicha dosis de Bzl reduce la actividad sérica de CK, un típico marcador de daño cardíaco.

Si bien otros autores se propusieron evaluar las propiedades antiinflamatorias de esta droga parasiticida en diferentes modelos experimentales de sepsis o macrófagos estimulados en cultivo, este efecto nunca fue estudiado en un modelo experimental de enfermedad de Chagas. En el hígado de ratones sépticos fue demostrado que Bzl a altas concentraciones (1mM) disminuye el ARNm y la expresión proteica de TNF- α y NOS2, mediante la inhibición de NF- κ B y MAPK (p-38 and ERK) (Piaggio et al., 2001). Asimismo, hay evidencias de que Bzl 1mM disminuye la producción de NO y la liberación de citoquinas en macrófagos RAW 264.7 estimulados con LPS y/o INF γ , impidiendo la activación NF- κ B a través de la inhibición de la fosforilación del inhibidor I κ B α (Manarin et al., 2010). Dado que en estos trabajos se utilizaron altas concentraciones de Bzl (1mM) *in vitro*, nosotros nos propusimos evaluar los efectos antiinflamatorios de Bzl a dosis más bajas, en las que se conserven las propiedades parasiticidas. En el modelo de cardiomiocitos aislados en cultivo infectados con la cepa RA de *T. cruzi* determinamos que 15 μ M de Bzl es la concentración óptima para reducir significativamente la carga parasitaria celular, evaluada por qPCR. Estos hallazgos nos guiaron a estudiar las propiedades antiinflamatorias de Bzl a esa concentración. Dado que *T. cruzi* posee componentes que inducen inflamación mediante el reconocimiento de TLR2 / TLR6 y TLR4, al igual que LPS, su uso resultó válido para estudiar los efectos antiinflamatorios de Bzl con independencia de sus propiedades parasiticidas (Dos-Santos et al., 2016; Rosadini et al., 2017).

Usando este abordaje, demostramos que, *in vitro*, una concentración de Bzl baja (15 μ M) es capaz de inhibir los niveles de NO y ARNm de IL-1 β , IL-6, NOS2 en cardiomiocitos estimulados. Un efecto similar ha sido reportado utilizando dosis de Bzl de 1mM en macrófagos estimulados con LPS (Piaggio et al., 2001; Manarin et al., 2010). Los mismos autores evaluaron los mecanismos responsables de la inhibición de

la expresión de NOS2 y la liberación de citoquinas proinflamatorias, determinando que la inhibición de la vía NF-KB es responsable de la regulación negativa de los mediadores proinflamatorios (Piaggio et al., 2001; Manarin et al., 2010). Nuestros resultados muestran que, en cardiomiocitos estimulados con LPS, 15 μ M de Bzl también inhibe esta vía, confirmando que los efectos antiinflamatorios de esta droga pueden ser alcanzados a concentraciones más bajas que las reportadas. Asimismo, Revelli y col. también demostraron que altas concentraciones de Bzl inhiben la liberación de NO, citoquinas proinflamatorias e inclusive IL-10 en macrófagos estimulados con LPS, sugiriendo que también puede alterar el balance entre la respuesta pro y antiinflamatoria (Revelli et al., 1999).

Dado que *T. cruzi* induce serias alteraciones cardíacas durante la fase crónica de la infección, nos resultó de sumo interés evaluar la efectividad de bajas dosis de Bzl en un modelo crónico de infección.

El estudio de la enfermedad de Chagas es abordado en general y según la bibliografía de referencia, a través de modelos experimentales murinos de infección con una sola cepa de *T. cruzi*. En ellos se analizan las consecuencias inmunológicas y/o patofisiológicas de esta enfermedad crónica. Mientras que esto puede ser beneficioso en términos de la simplicidad del modelo, podría no ser totalmente representativo de lo que puede ocurrir en las zonas endémicas. En ellas, en el contexto de la transmisión vectorial en áreas rurales y suburbanas, un individuo puede estar expuesto a reinfecciones por varias poblaciones de *T. cruzi*, las cuales pueden diferir en su virulencia, tropismo, inmunogenicidad y genética (Tomasini et al., 2017). Esto, también, puede ser condicionado por la diversidad de genotipos presentes en un área geográfica específica. En este sentido, estudios previos han mostrado que infecciones múltiples llevan a empeorar la reacción inflamatoria (Bustamante et al., 2002, 2003, 2004, Andrade et al., 2006) y las consecuencias inmunopatológicas de los ratones infectados (da Silva Guerreiro et al., 2015). De hecho, en nuestro laboratorio, no hemos conseguido reproducir la disfunción cardíaca característica de la enfermedad de Chagas humana con una única población de *T. cruzi*. Por lo tanto, el modelo descrito en este trabajo incluye esta variable, que simula lo que puede ocurrir en las áreas

endémicas. Las particularidades biológicas (tropismo tisular, letalidad, etc) (González Cappa et al., 1980, 1981a, 1981b, Mirkin et al., 1994, 1997), inmunológicas (desarrollo de respuesta humoral y celular) (Muller et al., 1986; Vogt et al., 2008) y genéticas (UDT) (Zingales et al., 2009) de las poblaciones parasitarias usadas en este trabajo han sido previamente caracterizadas. Esto nos permitió diseñar un modelo mixto de infección que emula lo que ocurre en los pacientes con enfermedad de Chagas crónica, tanto en términos de la disfunción ventricular como de sus consecuencias patofisiológicas asociadas a la respuesta inflamatoria exacerbada y a la fibrosis reactiva.

En nuestro modelo de infección pudimos observar aumento en los diámetros de fin de diástole y de sístole, evaluado por ecocardiografía, consistentes con eventos de remodelación cardíaca y dilatación ventricular. La disfunción sistólica evidenciada por la disminución en la fracción de eyección y de acortamiento, coincide con la encontrada en pacientes con cardiopatía chagásica crónica (Viotti et al., 2004; Xavier et al., 2005; Carod-Artal, 2010; Fragata et al., 2015; Bocchi et al., 2017). Además, observamos una prolongación en el tiempo de relajación isovolumétrico, evaluado por ecocardiografía *Doppler*. Este tipo de comportamiento se observa en la disfunción diastólica de Tipo I, en la cual hay una relajación lenta, generalmente asociada a una hipertrofia del ventrículo izquierdo y frecuentemente encontrada en pacientes con enfermedad de Chagas (Combellas et al., 1985; Acquatella, 2007). Es sabido que la alteración de estos parámetros está involucrada en la alta morbilidad de los pacientes con enfermedad de Chagas (Ribeiro et al., 2012; Vilar-Pereira et al., 2016a).

Existe una premisa general que expone que el tratamiento etiológico contribuye a reducir la carga parasitaria y dirigir al sistema inmune hacia una respuesta inflamatoria balanceada, que sería crucial para el control de la infección y de la morbilidad de la enfermedad de Chagas (García et al., 2005; Viotti et al., 2006). Sin embargo, aunque la dosis de Bzl utilizada en la primer parte de la tesis muestra ser eficaz para eliminar completamente los parásitos (Figuras 2 y 3), no fue capaz de restaurar la disfunción sistólica en ratones con infección mixta con *T. cruzi*. Estos resultados concuerdan con estudios en los que muestra que si bien Bzl a altas dosis reduce la prolongación del intervalo PR, falla en mejorar la función cardíaca al fin del experimento (Zaidenberg et al., 2006). Además, un estudio reciente llevado a cabo en

un modelo murino de Chagas experimental con la cepa Colombiana, muestran que Bzl no restaura los intervalos QTc a valores normales (Vilar-Pereira et al., 2016b). Asimismo, en el ensayo clínico BENEFIT (prospectivo, multicéntrico y aleatorizado), que fue diseñado para evaluar la seguridad y eficacia del Bzl en pacientes con cardiomiopatía chagásica, se demostró que el tratamiento con Bzl disminuyó significativamente la detección del parásito en suero (comparado con el placebo), pero no logró reducir el deterioro clínico cardíaco de los pacientes seguidos durante 5 años (Morillo et al., 2015). Resultados similares se observaron en el ensayo clínico TRAENA (Aleatorizado, Doble Ciego, Fase III). En este, los autores muestran que el franco efecto parasiticida de Bzl, evaluado por serología y qPCR, no se asoció a diferente evolución clínica (Riarte, 2015; Pays, 2016; Sociedad Argentina de Protozoología, 2016).

Durante muchos años el papel de la inflamación en la enfermedad de Chagas ha sido controvertido, ya que se ha demostrado que puede tener efectos tanto protectores como lesivos. Algunos autores han reportado que la presencia de NOS2 y la consecuente liberación de NO es deseable y necesaria para la eliminación del parásito (Fichera et al., 2004; Dos-Santos et al., 2016). Sin embargo, se ha descrito tanto en modelos animales como en pacientes con enfermedad de Chagas, que un exceso en la producción de NO y TNF- α puede provocar daños en el miocardio, contribuyendo a la disfunción cardíaca (Huang et al., 1999; Durand et al., 2009). En trabajos previos de nuestro laboratorio hemos demostrado que la infección con *T. cruzi* produce una intensa respuesta inflamatoria en distintos modelos experimentales *in vitro*, tales como cultivos primarios de células cardíacas (Hovsepian et al., 2011) o de macrófagos peritoneales (Penas et al., 2015), e *in vivo* en corazón (Penas et al., 2013) y en hígado (Penas y Cevy et al., 2016). Actualmente existe un amplio consenso sobre el origen inflamatorio de la patología chagásica, y es considerada un síndrome miocardiopático inflamatorio (Trachtenberg et al., 2017).

Es en este marco que nos resultó de gran interés evaluar el estado inflamatorio en el modelo murino de infección mixta que evidencia disfunción ventricular. Pudimos comprobar que la disfunción observada se asocia a una intensa respuesta inflamatoria cardíaca, con alta expresión y liberación de citoquinas y enzimas proinflamatorias como IL-6, TNF- α y NOS2. Además, los corazones presentan infiltrados inflamatorios

difusos, signos de fibrosis reactiva y una elevada expresión de marcadores proinflamatorios y de remodelación cardíaca.

En trabajos previos del grupo demostramos que PPAR γ , factor de transcripción dependientes de ligando, participa en la regulación de la inflamación. Demostramos que el tratamiento *in vivo* con un ligando natural de PPAR γ , la 15-deoxi-prostaglandina-J2 (15dPGJ2), fue capaz de modular la respuesta inflamatoria cardíaca exacerbada (Hovsepien et al., 2011; Penas et al., 2013). Esta regulación conlleva la inhibición de la producción de citoquinas y mediadores inflamatorios y la reducción de depósitos de colágeno modulando la fibrosis que se manifiesta en la cardiopatía. Por otra parte, en un trabajo previo del grupo hemos reportado que 15dPGJ2 pero no rosiglitazona, inhibió la respuesta inflamatoria en células cardíacas estimuladas con LPS (Hovsepien et al., 2010). Asimismo, en los últimos años se ha reportado que el tratamiento de la diabetes mellitus con Tiazolidinadionas, ligandos sintéticos de PPAR γ , como rosiglitazona o pioglitazona puede incrementar el riesgo de falla cardíaca en estos pacientes (Nissen et al., 2007; Singh et al., 2015; Liao et al., 2017). En este sentido recientemente se demostró, también en un modelo de células cardíacas en cultivo, que la rosiglitazona promueve la hipertrofia cardíaca y altera la remodelación de la cromatina (Pharaon et al., 2017). Con vistas a superar los efectos adversos cardíacos de estos agonistas, nos planteamos evaluar en un modelo murino de infección con *T. cruzi*, un nuevo ligando sintético de PPAR γ derivado del ácido hidroxipiridincarboxílico, HP24. Pudimos determinar que HP24 inhibió la respuesta inflamatoria y paralelamente promovió la formación de nuevos vasos (Penas et al., 2017). Asimismo, ha sido reportado que fenofibrato (Fen), un ligando PPAR alfa, tiene actividad terapéutica en modelos murinos que emulan enfermedades inflamatorias humanas, como la encefalomiелitis autoimmune (Lovett-Racke et al., 2004), la enfermedad inflamatoria intestinal (Lee et al., 2007), la inflamación de las vías respiratorias (Delayre-Orthez et al., 2005), o la artritis (Oliveira et al., 2007), entre otras. Además, el Fen ha mostrado tener efectos cardioprotectivos en modelos de miocarditis autoimmune (Cheng et al., 2016), de inflamación de musculo esquelético (Dai et al., 2016), y en modelos de isquemia/reperfusión (I/R) cardíaca. En este sentido, ha sido demostrado que Clofibrato y Fen son capaces de ejercer cardioprotección en la

injuria cardíaca inducida por I/R en ratas, en términos de reducción del tamaño del infarto, disminución de la actividad de CK en el efluente coronario, y del estrés oxidativo (Sugga et al., 2012).

Tomando en cuenta estos antecedentes, en la segunda parte de este trabajo, nos propusimos evaluar el tratamiento conjunto de Bzl como antiparasitario y el Fen como antiinflamatorio, con el fin de revertir la disfunción ventricular. Esta estrategia coincide con el objetivo del programa DNDi, que propone mejorar la eficacia de las drogas disponibles, ya sea disminuyendo las dosis o combinándolas con otros fármacos que estén disponibles en el mercado para otras patologías (Drugs for Neglected Diseases initiative (DNDi), 2017).

El principal resultado de esta segunda parte del trabajo de tesis es que el tratamiento con Fen revierte la disfunción diastólica y sistólica del ventrículo izquierdo producida por la infección, restaurando a valores normales el tiempo de relajación isovolumétrico, la fracción de eyección y la fracción de acortamiento.

Los efectos de Fen se suman a la eliminación completa de la carga parasitaria por el Bzl a baja dosis. Además, demostramos que el tratamiento conjunto es capaz de disminuir la actividad sérica de la enzima Creatina Kinasa y la respuesta inflamatoria, reduciendo la expresión y liberación de enzimas y citoquinas proinflamatorias, como IL-6, TNF- α y NOS2. Por otra parte, el tratamiento conjunto atenúa la fibrosis y reduce la expresión de citoquinas profibróticas, como CTGF y enzimas involucradas en la remodelación como MMP-9, en los ratones crónicamente infectados con *T. cruzi*. Cabe destacar que el tratamiento con Fen no tiene efecto sobre la parasitemia, lo que sugiere que la reacción inflamatoria exacerbada observada en los ratones infectados no estaría cumpliendo un rol efectivo en la eliminación de los parásitos en este modelo. Además, el Fen no interfiere con el efecto de Bzl, logrando con el tratamiento conjunto la eliminación de los parásitos en el torrente sanguíneo y en el miocardio.

Una vez demostrado el efecto antiinflamatorio de Fen, quisimos estudiar los mecanismos moleculares involucrados. Para ello, utilizamos un modelo *in vitro* de células cardíacas infectadas con *T. cruzi*.

Dado que la activación de NF- κ B ha sido correlacionada con diversas enfermedades cardiovasculares (aterosclerosis, isquemia del miocardio, falla cardíaca

e hipertrofia cardíaca) (Panday et al., 2016), y que ha sido descrito que PPAR α es capaz de inhibir esta vía por varios mecanismos (Delerive et al., 1999; Zhang et al., 2014), nos propusimos evaluar si NF- κ B se encontraba involucrado en los efectos de Fen. En este sentido, la inhibición de la vía de señalización de NF- κ B por Fen fue reportada en diferentes modelos experimentales (Shen et al., 2014; Garcia-Ramírez et al., 2016; Jen et al., 2016). En este trabajo hemos demostrado que la infección con *T. cruzi* activa la vía NF- κ B evidenciada por la desaparición citosólica del inhibidor I κ -B α , y que Fen es capaz de prevenir esta activación. Además que, al menos en parte, estos efectos ocurren de manera dependiente de su receptor. Dado que NF- κ B tiene un rol destacado en la regulación de la inflamación y la supervivencia celular (Papa et al., 2009), puede ser necesario un ajuste fino dirigido a este factor para tratar adecuadamente enfermedades en las que está implicada su desregulación. Cabe destacar, sin embargo, que el tratamiento con Fen previene esta activación, resultando beneficioso en términos de inflamación tisular y restauración funcional.

Dado que la reacción inflamatoria tiene un papel relevante en el desarrollo de la patología chagásica, el estudio de fármacos que modulen esta respuesta es importante como estrategia coadyuvante al tratamiento parasiticida.

Teniendo en cuenta que uno de los objetivos de la Iniciativa sobre Drogas para Enfermedades Desatendidas (DNDi) es desarrollar nuevas estrategias terapéuticas usando drogas que actualmente se usen para otras patologías, y teniendo en cuenta los resultados obtenidos en este trabajo de tesis, consideramos que el tratamiento conjunto con Fen y Bzl sería un punto de partida para futuros ensayos clínicos, en la búsqueda de la reversión de la patología en pacientes con Enfermedad de Chagas.

CONCLUSIONES

“Ella está en el horizonte.

Me acerco dos pasos, ella se aleja dos pasos.

Camino diez pasos y el horizonte se corre diez pasos más allá.

Por mucho que camine, nunca la alcanzaré.

Entonces, ¿Para qué sirve la utopía?

Para eso sirve: Para caminar”

Fernando Birri (popularizada por Eduardo Galeano)

- ✚ Bzl tiene eficacia parasiticida, *in vivo e in vitro*, a una dosis más baja que las reportadas en la bibliografía para el tratamiento de un modelo letal de Chagas experimental. Asimismo, actúa como modulador de la respuesta inflamatoria y en este efecto está involucrada la inactivación de la vía NF-κB.
- ✚ Fenofibrato revierte la disfunción sistólica y diastólica en el modelo de infección mixta con el clon K98 y la cepa RA de *T. cruzi*. Además, modula la respuesta inflamatoria y profibrótica.
- ✚ La terapia combinada con Fenofibrato y Benznidazol a bajas dosis mejora la patología cardíaca producida por la infección mixta con *T. cruzi*, tanto en términos parasitológicos como fisiopatológicos, por lo que tendría potencial para futuros ensayos clínicos en pacientes con enfermedad de Chagas crónica.

BIBLIOGRAFÍA

*“En el andar incesante del tiempo
los hombres cambian y se suceden
pero la humanidad adelanta siempre
y cada generación
tiene su deber en esta obra común”*

Bernardo A. Houssay

- Abbas, A.K., Lichtman, A.H., 2006. *Citocinas, Inmunología celular y molecular*. Elsevier Inc.
- Acquatella, H., 2007. Echocardiography in Chagas heart disease. *Circulation* 115, 1124–1131.
- Alderton, W.K., Cooper, C.E., Knowles, R.G., 2001. Nitric oxide synthases: structure, function and inhibition. *Biochem. J.* 357, 593–615.
- Alsford, S., Kelly, J.M., Baker, N., Horn, D., 2013. Genetic dissection of drug resistance in trypanosomes. *Parasitology* 140, 1478–91.
- Andrade, S.G., Campos, R.F., Castro Sobral, K.S., Magalhães, J.B., Pereira Guedes, R.S., Guerreiro, M.L., 2006. Reinfections with strains of *Trypanosoma cruzi*, of different biotopes as a factor of aggravation of myocarditis and myositis in mice. *Rev. Soc. Bras. Med. Trop.* 39, 1–8.
- Andrade, Z.A., Andrade, S.G., Sadigursky, M., 1987. Enhancement of chronic *Trypanosoma cruzi* myocarditis in dogs treated with low doses of cyclophosphamide. *Am. J. Pathol.* 127, 467–73.
- Angheben, A., Boix, L., Buonfrate, D., Gobbi, F., Bisoffi, Z., Pupella, S., Gandini, G., Aprili, G., 2015. Chagas disease and transfusion medicine: a perspective from non-endemic countries. *Blood Transfus.* 13, 540–550.
- Antinori, S., Galimberti, L., Bianco, R., Grande, R., Galli, M., Corbellino, M., 2017. Chagas disease in Europe: A review for the internist in the globalized world. *Eur. J. Intern. Med.*
- Araújo-jorge, T.C., Waghbi, M.C., Bailly, S., Feige, J., 2012. The TGF- β Pathway as an Emerging Target for Chagas Disease Therapy 92.
- Assíria Fontes Martins, T., de Figueiredo Diniz, L., Mazzeti, A.L., da Silva do Nascimento, Á.F., Caldas, S., Caldas, I.S., de Andrade, I.M., Ribeiro, I., Bahia, M.T., 2015. Benznidazole/Itraconazole Combination Treatment Enhances Anti-*Trypanosoma cruzi* Activity in Experimental Chagas Disease. *PLoS One* 10, e0128707.
- Basso, B., 2013. Modulation of immune response in experimental Chagas disease. *World J. Exp. Med.* 3, 1–10.
- Benziger, C.P., do Carmo, G.A.L., Ribeiro, A.L.P., 2017. Chagas Cardiomyopathy. *Cardiol. Clin.* 35, 31–47.

- Bern, C., Martin, D.L., Gilman, R.H., 2011. Acute and Congenital Chagas Disease. *Adv. Parasitol.* 75, 19–47.
- Bern, C., Montgomery, S.P., 2009. An Estimate of the Burden of Chagas Disease in the United States. *Clin. Infect. Dis.* 49, e52–e54.
- Biernacka, A., Dobaczewski, M., Frangogiannis, N.G., 2011. TGF- β signaling in fibrosis. *Growth Factors* 29, 196–202.
- Bocchi, E.A., Bestetti, R.B., Scanavacca, M.I., Cunha Neto, E., Issa, V.S., 2017. Chronic Chagas Heart Disease Management. *J. Am. Coll. Cardiol.* 70, 1510–1524.
- Bookout, A.L., Jeong, Y., Downes, M., Yu, R.T., Evans, R.M., Mangelsdorf, D.J., 2006. Anatomical Profiling of Nuclear Receptor Expression Reveals a Hierarchical Transcriptional Network. *Cell* 126, 789–799.
- Boron, W., Boulpaep, E., 2016. The heart as a pump. In: Elsevier (Ed.), *Medical Physiology*.
- Bradford MM, 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem* 72, 248–54.
- Brener, Z., 1962. Observations on immunity to superinfections in mice experimentally inoculated with *Trypanosoma cruzi* and subjected to treatment. *Rev. Inst. Med. Trop. Sao Paulo* 4, 119–123.
- Brisse, S., Barnabe, C., Tibayrenc, M., 2000. Identification of six *Trypanosoma cruzi* phylogenetic lineages by random amplified polymorphic DNA and multilocus enzyme electrophoresis 30, 35–44.
- Buscaglia, C.A., Di Noia, J.M., 2003. *Trypanosoma cruzi* clonal diversity and the epidemiology of Chagas' disease. *Microbes Infect.*
- Bustamante, J.M., Rivarola, H.W., Fernández, A.R., Enders, J.E., Fretes, R., Palma, J.A., Paglini-Oliva, P.A., 2002. *Trypanosoma cruzi* reinfections in mice determine the severity of cardiac damage. *Int. J. Parasitol.* 32, 889–896.
- Bustamante, J.M., Rivarola, H.W., Fernández, A.R., Enders, J.E., Fretes, R., Palma, J.A., Paglini-Oliva, P.A., 2003. Indeterminate Chagas' disease: *Trypanosoma cruzi* strain and re-infection are factors involved in the progression of cardiopathy. *Clin. Sci.* 104, 415.

- Bustamante, J.M., Rivarola, H.W., Palma, J.A., Paglini-Oliva, P.A., 2004. Electrocardiographic characterization in *Trypanosoma cruzi* reinfected mice. *Parasitology* 128, 415–9.
- Cardinal, M. V., Lauricella, M.A., Ceballos, L.A., Lanati, L., Marcet, P.L., Levin, M.J., Kitron, U., Gürtler, R.E., Schijman, A.G., 2008. Molecular epidemiology of domestic and sylvatic *Trypanosoma cruzi* infection in rural northwestern Argentina. *Int. J. Parasitol.* 38, 1533–1543.
- Cardoso, M.S., Reis-Cunha, J.L., Bartholomeu, D.C., 2016. Evasion of the immune response by *trypanosoma cruzi* during acute infection, *Frontiers in Immunology*. *Frontiers*.
- Carlier, Y., Sosa-estani, S., Luquetti, A.O., Buekens, P., 2015. Congenital Chagas disease : an update 110, 363–368.
- Carod-Artal, F.J., 2010. Trypanosomiasis, cardiomyopathy and the risk of ischemic stroke. *Expert Rev. Cardiovasc. Ther.* 8, 717–728.
- Celentano, A.M., González Cappa, S.M., 1993. In vivo macrophage function in experimental infection with *Trypanosoma cruzi* subpopulations. *Acta Trop.* 55, 171–80.
- Chagas, C., 1909. Nova tripanozomiaze humana: estudos sobre a morfologia e o ciclo evolutivo do *Schizotrypanum cruzi* n. gen., n. sp., agente etiolojico de nova entidade morbida do homem. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz*.
- Chatelain, E., 2015. Chagas Disease Drug Discovery. *J. Biomol. Screen.* 20, 22–35.
- Chen, W., Jin, W., Hardegen, N., Lei, K., Li, L., Marinos, N., McGrady, G., Wahl, S.M., 2003. Conversion of Peripheral CD4 + CD25 – Naive T Cells to CD4 + CD25 + Regulatory T Cells by TGF- β Induction of Transcription Factor Foxp3. *J. Exp. Med.* 198, 1875–1886.
- Chen, Y., Kuchroo, V.K., Inobe, J., Hafler, D.A., Weiner, H.L., 1994. Regulatory T cell clones induced by oral tolerance: suppression of autoimmune encephalomyelitis. *Science* 265, 1237–40.
- Cheng, H., Xi, Y., Chi, X., Wu, Y., Liu, G., 2016. Fenofibrate treatment of rats with experimental autoimmune myocarditis by alleviating Treg/Th17 disorder. *Cent. Eur. J. Immunol.* 1, 64–70.

- Combellas, I., Puigbo, J.J., Acquatella, H., Tortoledo, F., Gomez, J.R., 1985. Echocardiographic features of impaired left ventricular diastolic function in Chagas's heart disease. *Br. Heart J.* 53, 298–309.
- Coura, J.R., 2009. Present situation and new strategies for Chagas disease chemotherapy: a proposal. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz* 104, 549–54.
- Cummings, K.L., Tarleton, R.L., 2003. Rapid quantitation of *Trypanosoma cruzi* in host tissue by real-time PCR. *Mol. Biochem. Parasitol.* 129, 53–9.
- Cutrullis, R.A., Poklépovich, T.J., Postan, M., Freilij, H.L., Petray, P.B., 2011. Immunomodulatory and anti-fibrotic effects of ganglioside therapy on the cardiac chronic form of experimental *Trypanosoma cruzi* infection. *Int. Immunopharmacol.* 11, 1024–1031.
- da Silva Guerreiro, M.L., Morais, I.R.B., Andrade, S.G., Guerreiro, M.L. da S., Morais, I.R.B., Andrade, S.G., 2015. Immunological response to re-infections with clones of the Colombian strain of *Trypanosoma cruzi* with different degrees of virulence: influence on pathological features during chronic infection in mice. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz* 110, 500–506.
- Dai, F., Jiang, T., Bao, Y., Chen, G., Chen, L., Zhang, Q., Lu, Y., 2016. Fenofibrate improves high-fat diet-induced and palmitate-induced endoplasmic reticulum stress and inflammation in skeletal muscle. *Life Sci.* 157, 158–167.
- Dardalhon, V., Awasthi, A., H, K., G, G., Gao, W., 2008. IL-4 inhibits TGF- β -induced Foxp3+ T cells and, together with TGF- β , generates IL-9+IL-10+Foxp3- effector T cells. *Nat Immunol* 9, 1347–1355.
- de Andrade, A.L., Zicker, F., de Oliveira, R.M., Almeida Silva, S., Luquetti, A., Travassos, L.R., Almeida, I.C., de Andrade, S.S., de Andrade, J.G., Martelli, C.M., 1996. Randomised trial of efficacy of benznidazole in treatment of early *Trypanosoma cruzi* infection. *Lancet (London, England)* 348, 1407–13.
- de Jong, S., van Veen, T.A.B., de Bakker, J.M.T., Van Rijen, H.V.M., 2012. Monitoring cardiac fibrosis: A technical challenge. *Netherlands Hear. J.* 20, 44–48.
- de Jong, S., van Veen, T. a B., van Rijen, H.V.M. V, de Bakker, J.M.T., 2011. Fibrosis and cardiac arrhythmias. *J. Cardiovasc. Pharmacol.* 57, 630–638.
- Deb, A., Ubil, E., 2014. Cardiac fibroblast in development and wound healing. *J. Mol.*

- Cell. Cardiol. 70, 47–55.
- Delayre-Orthez, C., Becker, J., Guenon, I., Lagente, V., Auwerx, J., Frossard, N., Pons, F., 2005. PPARalpha downregulates airway inflammation induced by lipopolysaccharide in the mouse. *Respir. Res.* 6, 91.
- Delerive, P., De Bosscher, K., Besnard, S., Vanden Berghe, W., Peters, J.M., Gonzalez, F.J., Fruchart, J.C., Tedgui, a, Haegeman, G., Staels, B., 1999. Peroxisome proliferator-activated receptor alpha negatively regulates the vascular inflammatory gene response by negative cross-talk with transcription factors NF-kappaB and AP-1. *J. Biol. Chem.* 274, 32048–32054.
- Delerive, P., De Bosscher, K., Vanden Berghe, W., Fruchart, J.-C., Haegeman, G., Staels, B., 2002. DNA binding-independent induction of IkappaBalpha gene transcription by PPARalpha. *Mol. Endocrinol.* 16, 1029–39.
- Devchand, P.R., Keller, H., Peters, J.M., Vazquez, M., Gonzalez, F.J., Wahli, W., 1996. The PPARalpha-leukotriene B4 pathway to inflammation control. *Nature* 384, 39–43.
- Dhiman, M., Coronado, Y.A., Vallejo, C.K., Petersen, J.R., Ejilemele, A., Nuñez, S., Zago, M.P., Spratt, H., Garg, N.J., 2013. Innate Immune Responses and Antioxidant/Oxidant Imbalance Are Major Determinants of Human Chagas Disease. *PLoS Negl. Trop. Dis.* 7, e2364.
- Dias, J.C., 1989. The indeterminate form of human chronic Chagas' disease A clinical epidemiological review. *Rev. Soc. Bras. Med. Trop.* 22, 147–56.
- Dobaczewski, M., Chen, W., Frangogiannis, N.G., 2011. Transforming growth factor (TGF)-β signaling in cardiac remodeling. *J. Mol. Cell. Cardiol.* 51, 600–606.
- Dos-Santos, A.L.A., Carvalho-Kelly, L.F., Dick, C.F., Meyer-Fernandes, J.R., 2016. Innate immunomodulation to trypanosomatid parasite infections. *Exp. Parasitol.*
- Drugs for Neglected Diseases Initiative, 2017. Clinical Trial: Study to Evaluate Fexinidazole Dosing Regimens for the Treatment of Adult Patients With Chagas Disease [Página Web]. URL: <https://www.dndi.org/diseases-projects/portfolio/fexinidazole-chagas/>
- Drugs for Neglected Diseases initiative (DNDi), 2017. Chagas Disease Project [Página Web]. URL: <https://www.dndi.org/diseases-projects/chagas/>

- Duffy, T., Bisio, M., Altcheh, J., Burgos, J.M., Diez, M., Levin, M.J., Favaloro, R.R., Freilij, H., Schijman, A.G., 2009. Accurate real-time PCR strategy for monitoring bloodstream parasitic loads in chagas disease patients. *PLoS Negl. Trop. Dis.* 3, e419.
- Durand, J.L., Mukherjee, S., Commodari, F., De Souza, A.P., Zhao, D., Machado, F.S., Tanowitz, H.B., Jelicks, L.A., 2009. Role of no synthase in the development of *Trypanosoma cruzi*-induced cardiomyopathy in mice. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 80, 782–787.
- Dutra, W.O., Menezes, C.A.S., Magalhães, L.M.D., Gollob, K.J., 2014. Immunoregulatory networks in human Chagas disease. *Parasite Immunol.*
- Eickhoff, C.S., Lawrence, C.T., Sagartz, J.E., Bryant, L.A., Labovitz, A.J., Gala, S.S., Hoft, D.F., 2010. ECG detection of murine chagasic cardiomyopathy. *J Parasitol* 96, 758–764.
- Engel, D., Peshock, R., Armstong, R.C., Sivasubramanian, N., Mann, D.L., 2004. Cardiac myocyte apoptosis provokes adverse cardiac remodeling in transgenic mice with targeted TNF overexpression. *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.* 287, H1303–H1311.
- Falasca, A., Grana, D., Buccolo, J., Gili, M., Merlo, A., Zoppi, J., Mareso, E., 1986. Susceptibility of the *Cebus apella* monkey to different strains of *T. cruzi* after single or repeated inoculations. *Bull. Pan Am. Health Organ.* 20, 117–137.
- FDA, 2017. Benznidazole: Highlights of Prescribing Information, U. S. Food and Drug Administration. United States.
- Feilij, H., Muller, L., Gonzalez Cappa, S.M., 1983. Direct micromethod for diagnosis of acute and congenital Chagas' disease. *J. Clin. Microbiol.* 18, 327–330.
- Fernández-Pérez, G.C., Franco López, García Fernández, M., Corral De La Calle, M., Encinas De La Iglesia, J., Velasco Casares, M., 2014. Función sistólica del ventrículo izquierdo: Cómo comprenderla y analizarla. *Radiología* 56, 505–514.
- Fichera, L.E., Albareda, M.C., Laucella, S.A., Postan, M., 2004. Intracellular Growth of *Trypanosoma cruzi* in Cardiac Myocytes Is Inhibited by Cytokine-Induced Nitric Oxide Release. *Infect. Immun.* 72, 359–363.
- Foligheddu, M., Górgolas, M., Ramos, J., 2017. Orally-transmitted Chagas disease.

- Med. Clínica (English Ed. 148, 125–131.
- Fragata, C. da S., Matsumoto, A.Y., Ramires, F.J.A., Fernandes, F., Buck, P. de C., Salemi, V.M.C., Nastari, L., Mady, C., Ianni, B.M., 2015. Left Atrial Function in Patients with Chronic Chagasic Cardiomyopathy. *Arq. Bras. Cardiol.* 28–36.
- Gao, J.W., Zhang, A.Q., Pan, W., Yue, C.L., Zeng, L., Gu, W., Jiang, J., 2015. Association between IL-6-174G/C polymorphism and the risk of sepsis and mortality: A systematic review and meta-analysis. *PLoS One* 10, 1–13.
- García-Ramírez, M., Hernández, C., Palomer, X., Vázquez-Carrera, M., Simó, R., 2016. Fenofibrate prevents the disruption of the outer blood retinal barrier through downregulation of NF- κ B activity. *Acta Diabetol.* 53, 109–118.
- García, S., Ramos, C.O., Senra, J.F. V, Vilas-Boas, F., Rodrigues, M.M., Campos-de-Carvalho, A.C., Ribeiro-Dos-Santos, R., Soares, M.B.P., 2005. Treatment with benznidazole during the chronic phase of experimental Chagas' disease decreases cardiac alterations. *Antimicrob. Agents Chemother.* 49, 1521–8.
- Goncalves, V.M., Matteucci, K.C., Buzzo, C.L., Miollo, B.H., Ferrante, D., Torrecilhas, A.C., Rodrigues, M.M., Alvarez, J.M., Bortoluci, K.R., 2013. NLRP3 Controls Trypanosoma cruzi Infection through a Caspase-1-Dependent IL-1R-Independent NO Production. *PLoS Negl. Trop. Dis.* 7, 1–11.
- González Cappa, S.M., Bijovsky, A.T., Freilij, H., Muller, L., Katzin, A.M., 1981a. Isolation of a Trypanosoma cruzi strain of predominantly slender form in Argentina. *Medicina (B. Aires).* 41, 119–20.
- González Cappa, S.M., Chiale, P., del Prado, G.E., Katzin, A.M., de Martini, G.W., de Isola, E.D., Abramo Orrego, L., Segura, E.L., 1980. Isolation of a strain of Trypanosoma cruzi from a patient with chronic Chagas cardiomyopathy and its biological characterization. *Medicina (B. Aires).* 40 Suppl 1, 63–8.
- González Cappa, S.M., Katzin, A.M., Añasco, N., Lajmanovich, S., 1981b. Comparative studies on infectivity and surface carbohydrates of several strains of Trypanosoma cruzi. *Medicina (B. Aires).* 41, 549–55.
- Goren, N., Cuenca, J., Martín-Sanz, P., Boscá, L., 2004. Attenuation of NF-kappaB signalling in rat cardiomyocytes at birth restricts the induction of inflammatory genes. *Cardiovasc. Res.* 64, 289–97.

- Gourbiere, S., Dorn, P., Tripet, F., Dumonteil, E., 2012. Genetics and evolution of triatomines : from phylogeny to vector control 108, 190–202.
- Granger, D., Taintor, R., Boockvar, K., Hibbs, J., 1996. Measurement of nitrate and nitrite in biological samples using nitrate reductase and Griess reaction. *Methods Enzym.* 268, 142–151.
- Grosso, N., Lopez Alarcon, M., Bua, J., Laucella, S.A., Riarte, A.R., Fichera, L.E., 2013. Combined treatment with benznidazole and allopurinol in mice infected with a virulent *Trypanosoma cruzi* isolate from Nicaragua. *Parasitology* 140, 1225–1233.
- Gruending, A.P., Massago, M., Teston, A.P.M., Monteiro, W.M., Kaneshima, E.N., Araújo, S.M., Gomes, M.L., Barbosa, M. das G. V, Toledo, M.J.O., 2015. Impact of benznidazole on infection course in mice experimentally infected with *Trypanosoma cruzi* I, II, and IV. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 92, 1178–89.
- Guay, D.R.P., 2002. Update on fenofibrate. *Cardiovasc. Drug Rev.* 20, 281–302.
- Guedes, P.M.M., Silva, G.K., Gutierrez, F.R.S., Silva, J.S., 2011. Current status of Chagas disease chemotherapy. *Expert Rev. Anti. Infect. Ther.* 9, 609–20.
- Gürtler, R.E., Cardinal, M. V., 2015. Reservoir host competence and the role of domestic and commensal hosts in the transmission of *Trypanosoma cruzi*. *Acta Trop.* 151, 32–50.
- Gutierrez, F.R.S., Guedes, P.M.M., Gazzinelli, R.T., Silva, J.S., 2009. The role of parasite persistence in pathogenesis of Chagas heart disease. *Parasite Immunol.* 31, 673–85.
- Guyton, A.C., Hall, J.E., 2011. El Corazón. In: *Tratado de Fisiología Médica.* pp. 101–113.
- Gwechenberger, M., Hulsmann, M., Berger, R., Graf, S., Springer, C., Stanek, B., Pacher, R., 2004. Interleukin-6 and B-type natriuretic peptide are independent predictors for worsening of heart failure in patients with progressive congestive heart failure. *J. Heart Lung Transplant.* 23, 839–844.
- Harmon, G.S., Lam, M.T., Glass, C.K., 2011. PPARs and lipid ligands in inflammation and metabolism. *Chem. Rev.* 111, 6321–6340.
- Hasslocher-Moreno, A.M., do Brasil, P.E.A.A., de Sousa, A.S., Xavier, S.S., Chambela, M.C., Sperandio da Silva, G.M., 2012. Safety of benznidazole use in the treatment of chronic Chagas' disease. *J. Antimicrob. Chemother.* 67, 1261–6.

- Haudek, S., Taffet, G., Schneider, M.D., Mann, D.L., 2007. TNF provokes cardiomyocyte apoptosis and cardiac remodeling through activation of multiple cell death pathways. *J. Clin. Invest.* 117, 2692–2701.
- Hayden, M.S., Ghosh, S., 2008. Shared Principles in NF- κ B Signaling. *Cell* 132, 344–362.
- Hovsepian, E., Mirkin, G.A., Penas, F., Manzano, A., Bartrons, R., Goren, N.B., 2011. Modulation of inflammatory response and parasitism by 15-Deoxy- Δ (12,14) prostaglandin J(2) in *Trypanosoma cruzi*-infected cardiomyocytes. *Int. J. Parasitol.* 41, 553–62.
- Hovsepian, E., Penas, F., Goren, N.B., 2010. 15-deoxy-Delta12,14 prostaglandin GJ2 but not rosiglitazone regulates metalloproteinase 9, NOS-2, and cyclooxygenase 2 expression and functions by peroxisome proliferator-activated receptor gamma-dependent and -independent mechanisms in cardiac cells. *Shock* 34, 60–7.
- Hovsepian, E., Penas, F., Mirkin, G.A., Goren, N.B., 2012. Role of PPARs in *Trypanosoma cruzi* Infection: Implications for Chagas Disease Therapy. *PPAR Res.* 2012, 528435.
- Howard, E., Xiong, X., Carlier, Y., Sosa-Estani, S., Buekens, P., 2013. Frequency of the congenital transmission of *Trypanosoma cruzi* : a systematic review and 1–12.
- Huang, H., Chan, J., Wittner, M., Jelicks, L.A., Morris, S.A., Factor, S.M., Weiss, L.M., Braunstein, V.L., Bacchi, C.J., Yarlett, N., Chandra, M., Shirani, J., Tanowitz, H.B., 1999. Expression of cardiac cytokines and inducible form of nitric oxide synthase (NOS2) in *Trypanosoma cruzi*-infected mice. *J. Mol. Cell. Cardiol.* 31, 75–88.
- Ignarro, L.J., 2002. Nitric oxide as a unique signaling molecule in the vascular system: A historical overview. *J. Physiol. Pharmacol.* 53, 503–514.
- Ijpenberg, A., Jeannin, E., Wahli, W., 1997. Polarity and Specific Sequence Requirements of Peroxisome Proliferator-activated Receptor (PPAR)/ Retinoid X Receptor Heterodimer Binding to DNA : A FUNCTIONAL ANALYSIS OF THE MALIC ENZYME GENE PPAR RESPONSE ELEMENT. *J. Biol. Chem.* 272, 20108–20117.
- Janicki, J.S., Brower, G.L., 2002. The role of myocardial fibrillar collagen in ventricular remodeling and function. *J. Card. Fail.* 8, S319–S325.
- Jansen, A.M., Xavier, S.C.C., Roque, A.L.R., 2017. Ecological aspects of *Trypanosoma cruzi*: Wild hosts and reservoirs. In: *American Trypanosomiasis Chagas Disease: One Hundred Years of Research: Second Edition.* pp. 243–264.

- Jen, H.-L., Liu, P.-L., Chen, Y.-H., Yin, W.-H., Chen, J.-W., Lin, S.-J., 2016. Peroxisome Proliferator-Activated Receptor α Reduces Endothelin-1-Caused Cardiomyocyte Hypertrophy by Inhibiting Nuclear Factor- κ B and Adiponectin. *Mediators Inflamm.* 2016, 1–11.
- Juiz, N.A., Cayo, N.M., Burgos, M., Salvo, M.E., Nasser, J.R., Búa, J., Longhi, S.A., Schijman, A.G., 2016. Human Polymorphisms in Placentally Expressed Genes and Their Association With Susceptibility to Congenital *Trypanosoma cruzi* Infection. *J. Infect. Dis.* 213, 1299–1306.
- Keating, S.M., Deng, X., Fernandes, F., Cunha-Neto, E., Ribeiro, A.L., Adesina, B., Beyer, A.I., Contestable, P., Custer, B., Busch, M.P., Sabino, E.C., NHLBI Retrovirus Epidemiology Donor Study-II (REDS-II), International Component, 2015. Inflammatory and cardiac biomarkers are differentially expressed in clinical stages of Chagas disease. *Int. J. Cardiol.* 199, 451–9.
- Kransdorf, E.P., Zakowski, P.C., Kobashigawa, J.A., 2014. Chagas disease in solid organ and heart transplantation. *Curr. Opin. Infect. Dis.* 27, 418–424.
- Kumar, A., Paladugu, B., Mensing, J., Kumar, A., Parrillo, J.E., 2007. Nitric oxide-dependent and -independent mechanisms are involved in TNF- α -induced depression of cardiac myocyte contractility. *Am. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol.* 292, R1900-6.
- Kumar, H., Kawai, T., Akira, S., 2011. Pathogen Recognition by the Innate Immune System. *Int. Rev. Immunol.* 30, 16–34.
- Lang, R.M., Badano, L.P., Mor-Avi, V., Afilalo, J., Armstrong, A., Ernande, L., Flachskampf, F.A., Foster, E., Goldstein, S.A., Kuznetsova, T., Lancellotti, P., Muraru, D., Picard, M.H., Rietzschel, E.R., Rudski, L., Spencer, K.T., Tsang, W., Voigt, J.U., 2015. Recommendations for cardiac chamber quantification by echocardiography in adults: An update from the American society of echocardiography and the European association of cardiovascular imaging. *Eur. Heart J. Cardiovasc. Imaging* 16, 233–271.
- Lee, J.W., Bajwa, P.J., Carson, M.J., Jeske, D.R., Cong, Y., Elson, C.O., Lytle, C., Straus, D.S., 2007. Fenofibrate Represses Interleukin-17 and Interferon- γ Expression and Improves Colitis in Interleukin-10-Deficient Mice. *Gastroenterology* 133, 108–123.

- Li, H., Sun, K., Zhao, R., Hu, J., Hao, Z., Wang, F., Lu, Y., Liu, F., Zhang, Y., 2018. Inflammatory biomarkers of coronary heart disease. *Front. Biosci. (Schol. Ed)*. 10, 185–196.
- Liao, H.-W., Saver, J.L., Wu, Y.-L., Chen, T.-H., Lee, M., Ovbiagele, B., 2017. Pioglitazone and cardiovascular outcomes in patients with insulin resistance, pre-diabetes and type 2 diabetes: a systematic review and meta-analysis. *BMJ Open* 7, e013927.
- Ling, H., Luoma, J.T., Hilleman, D., 2013. A Review of Currently Available Fenofibrate and Fenofibric Acid Formulations. *Rev. Cardiol Res @BULLET* 4, 47–55.
- Lockyer, P., Schisler, J.C., Patterson, C., Willis, M.S., 2010. Minireview: Won't Get Fooled Again: The Nonmetabolic Roles of Peroxisome Proliferator-Activated Receptors (PPARs) in the Heart. *Mol. Endocrinol.* 24, 1111–1119.
- Lovett-Racke, A.E., Hussain, R.Z., Northrop, S., Choy, J., Rocchini, A., Matthes, L., Chavis, J.A., Diab, A., Drew, P.D., Racke, M.K., 2004. Peroxisome proliferator-activated receptor alpha agonists as therapy for autoimmune disease. *J. Immunol.* 172, 5790–5798.
- Machado, F., Jelicks, L., Kirchhoff, L., Shirani, J., Nagajyothi, F., Mukherjee, S., Nelson, R., Coyle, C., Spray, D., Campos de Carvalho, A., Guan, F., Prado, C., Lisanti, M., Weiss, L., Montgomery, S., Tanowitz, H.B., 2012. Chagas Heart Disease: Report on Recent Developments. *Cardiol Rev* 20, 53–65.
- Machado, F.S., Tanowitz, H.B., Ribeiro, A.L., 2013. Pathogenesis of Chagas cardiomyopathy: Role of inflammation and oxidative stress. *J. Am. Heart Assoc.* 2, 8–11.
- Maguire, J.H., 2015. Treatment of Chagas' Disease — Time Is Running Out. *N. Engl. J. Med.* 373, 1369–1370.
- Manarin, R., Pascutti, M.F., Ruffino, J.P., De Las Heras, B., Boscá, L., Bottasso, O., Revelli, S., Serra, E., 2010. Benznidazole blocks NF-kappaB activation but not AP-1 through inhibition of IKK. *Mol. Immunol.* 47, 2485–91.
- Marin-Neto, J.A., Cunha-Neto, E., Maciel, B.C., Simões, M. V, 2007. Pathogenesis of chronic Chagas heart disease. *Circulation* 115, 1109–23.
- Martínez-díaz, R.A., Escario, J.A., Nogal-ruiz, J.J., Gómez-barrio, A., 2001. Biological Characterization of *Trypanosoma cruzi* Strains 96, 53–59.

- Martins, H.R., Figueiredo, L.M., Valamiel-Silva, J.C.O., Carneiro, C.M., Machado-Coelho, G.L.L., Vitelli-Avelar, D.M., Bahia, M.T., Martins-Filho, O.A., Macedo, A.M., Lana, M., 2008. Persistence of PCR-positive tissue in benznidazole-treated mice with negative blood parasitological and serological tests in dual infections with *Trypanosoma cruzi* stocks from different genotypes. *J. Antimicrob. Chemother.* 61, 1319–1327.
- Marx, N., Kehrle, B., Kohlhammer, K., Grüb, M., Koenig, W., Hombach, V., Libby, P., Plutzky, J., 2002. PPAR activators as antiinflammatory mediators in human T lymphocytes: Implications for atherosclerosis and transplantation-associated arteriosclerosis. *Circ. Res.* 90, 703–710.
- Marx, N., Mackman, N., Schonbeck, U., Yilmaz, N., Hombach, V., Libby, P., Plutzky, J., 2001. PPAR Activators Inhibit Tissue Factor Expression and Activity in Human Monocytes. *Circulation* 103, 213–219.
- Massion, P.B., Feron, O., Dessy, C., Balligand, J.-L., 2003. Nitric oxide and cardiac function: ten years after, and continuing. *Circ. Res.* 93, 388–98.
- Maya, J.D., Cassels, B.K., Iturriaga-Vásquez, P., Ferreira, J., Faúndez, M., Galanti, N., Ferreira, A., Morello, A., 2007. Mode of action of natural and synthetic drugs against *Trypanosoma cruzi* and their interaction with the mammalian host. *Comp. Biochem. Physiol. A. Mol. Integr. Physiol.* 146, 601–20.
- Maya, J.D., Orellana, M., Ferreira, J., Kemmerling, U., López-Muñoz, R., Morello, A., 2010. Chagas disease: Present status of pathogenic mechanisms and chemotherapy. *Biol. Res.* 43, 323–331.
- Mazza, S., 1934. Casos agudos benignos de enfermedad de Chagas comprobados en la provincia de Jujuy. *MePRA* 17, 3–11.
- Mazza, S., 1943. Comprobaciones de *Triatoma platensis*, *Eutriatoma oswaldoi*, *Pastrongylus seai* y *Psamulester coreodes* en la provincia de Santiago del Estero, todas ellas sobre infestación por *T. cruzi*. Otros datos sobre infestación esquizotripanosómica natural silvestre de. *Prensa Médica Arg* 30, 1583–1595.
- Mazza S, Montana A, B.C. y co, 1936. Transmisión de *Schizotrypanum cruzi* al niño por la leche de la madre con enfermedad de Chagas. *MePRA* 28, 41–46.
- McVicker, B.L., Bennett, R.G., 2017. Novel anti-fibrotic therapies. *Front. Pharmacol.* 8,

1–21.

- Mejia, A.M., Hall, B.S., Taylor, M.C., Gómez-Palacio, A., Wilkinson, S.R., Triana-Chávez, O., Kelly, J.M., 2012. Benznidazole-resistance in *Trypanosoma cruzi* is a readily acquired trait that can arise independently in a single population. *J. Infect. Dis.* 206, 220–8.
- Michalik, L., Auwerx, J., Berger, J.P., Chatterjee, V.K., Glass, C.K., Gonzalez, F.J., Grimaldi, P. a, Kadowaki, T., Lazar, M. a, Rahilly, S.O., Palmer, C.N. a, Plutzky, J., Reddy, J.K., Spiegelman, B.M., Staels, B., 2006. International Union of Pharmacology. LXI. Peroxisome Proliferator-Activated Receptors. *Pharmacol. Rev.* 58, 726–741.
- Miles, M.A., Cedillos, R., Póvoa, M., de Souza, A., Prata, A., Macedo, V., 1981. Do radically dissimilar *Trypanosoma cruzi* strains (zymodemes) cause Venezuelan and Brazilian forms of Chagas' disease? *Lancet* 1, 1338–1340.
- Miller, D.A., Hernandez, S., Rodriguez De Armas, L., Eells, S.J., Traina, M.M., Miller, L.G., Meymandi, S.K., 2015. Tolerance of benznidazole in a United States Chagas Disease clinic. *Clin. Infect. Dis.* 60, 1237–40.
- Ministerio de Salud de Argentina, 2013. Atención del paciente infectado con *Trypanosoma cruzi* . GUIA PARA EL EQUIPO DE SALUD. In: Atención Del Paciente Infectado Con *Trypanosoma Cruzii* . GUIA PARA EL EQUIPO DE SALUD. pp. 1–90.
- Mirkin, G.A., Celentano, A.M., Malchiodi, E.L., Jones, M., González Cappa, S.M., 1997. Different *Trypanosoma cruzi* strains promote neuromyopathic damage mediated by distinct T lymphocyte subsets. *Clin. Exp. Immunol.* 107, 328–34.
- Mirkin, G.A., Jones, M., Sanz, O.P., Rey, R., Sica, R.E., González Cappa, S.M., 1994. Experimental Chagas' disease: electrophysiology and cell composition of the neuromyopathic inflammatory lesions in mice infected with a myotropic and a pantropic strain of *Trypanosoma cruzi*. *Clin. Immunol. Immunopathol.* 73, 69–79.
- Mitelman, J., Argentinian Society of Cardiology, 2011. Consensus Statement on Chagas-Mazza Disease. *Argentinian J. Cardiol.* 79, 544–564.
- Molina-Berríos, A., Campos-Estrada, C., Lapier, M., Duaso, J., Kemmerling, U., Galanti, N., Leiva, M., Ferreira, J., López-Muñoz, R., Maya, J.D., 2013. Benznidazole prevents endothelial damage in an experimental model of Chagas disease. *Acta*

- Trop. 127, 6–13.
- Monge-Maillo, B., López-Vélez, R., 2017. Challenges in the management of Chagas disease in Latin-American migrants in Europe. *Clin. Microbiol. Infect.* 23, 290–295.
- Moreira, L.O., Zamboni, D.S., 2012. NOD1 and NOD2 signaling in infection and inflammation. *Front. Immunol.* 3.
- Morillo, C.A., Marin-Neto, J.A., Avezum, A., Sosa-Estani, S., Rassi, A., Rosas, F., Villena, E., Quiroz, R., Bonilla, R., Britto, C., Guhl, F., Velazquez, E., Bonilla, L., Meeks, B., Rao-Melacini, P., Pogue, J., Mattos, A., Lazdins, J., Connolly, S.J., Yusuf, S., 2015. Randomized Trial of Benznidazole for Chronic Chagas' Cardiomyopathy. *N. Engl. J. Med.* 373, 1295–1306.
- Muller, L.A., Añasco, N., González Cappa, S.M., 1986. *Trypanosoma cruzi*: isolate dependence in the induction of lytic antibodies in the mouse and rabbit. *Exp. Parasitol.* 61, 284–93.
- Muñoz-Fernández, M.A., Fernández, M.A., Fresno, M., 1992. Activation of human macrophages for the killing of intracellular *Trypanosoma cruzi* by TNF-alpha and IFN-gamma through a nitric oxide-dependent mechanism. *Immunol. Lett.* 33, 35–40.
- Nagueh, S.F., Smiseth, O.A., Appleton, C.P., Byrd, B.F., Dokainish, H., Edvardsen, T., Flachskampf, F.A., Gillebert, T.C., Klein, A.L., Lancellotti, P., Marino, P., Oh, J.K., Alexandru Popescu, B., Waggoner, A.D., 2016. Recommendations for the Evaluation of Left Ventricular Diastolic Function by Echocardiography: An Update from the American Society of Echocardiography and the European Association of Cardiovascular Imaging. *Eur. Hear. J. – Cardiovasc. Imaging* 17, 1321–1360.
- Napetschnig, J., Wu, H., 2013. Molecular Basis of NF-κB Signaling 42, 443–468.
- National Center for Biotechnology Information. PubChem Compound Database, 2017. Fenofibrate [Página Web]. URL: <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/fenofibrate>
- NCI Thesaurus. NIH, 2017. Fenofibrate (Code C29047) [Página Web]. URL: https://ncit.nci.nih.gov/ncitbrowser/ConceptReport.jsp?dictionary=NCI_Thesaurus&ns=NCI_Thesaurus&code=C29047
- NIH Clinical Trials Database, 2017. Clinical Trials Database [Página Web]. URL:

- <https://www.clinicaltrials.gov/>
- Nissen, S.E., Wolski, K., 2007. Effect of Rosiglitazone on the Risk of Myocardial Infarction and Death from Cardiovascular Causes. *N. Engl. J. Med.* 356, 2457–2471.
- Noguerado-Mellado, B., Rojas-Pérez-Ezquerro, P., Calderón-Moreno, M., Morales-Cabeza, C., Tornero-Molina, P., 2016. Allergy to benzimidazole: cross-reactivity with other nitroimidazoles. *J. Allergy Clin. Immunol. Pract.* doi: 10.10, 827–828.
- Nunes, M.C.P., Dones, W., Morillo, C.A., Encina, J.J., Ribeiro, A.L., 2013. Chagas disease: An overview of clinical and epidemiological aspects. *J. Am. Coll. Cardiol.*
- Oliveira, A.C.P., Bertollo, C.M., Rocha, L.T.S., Nascimento, E.B., Costa, K.A., Coelho, M.M., 2007. Antinociceptive and antiedematogenic activities of fenofibrate, an agonist of PPAR alpha, and pioglitazone, an agonist of PPAR gamma. *Eur. J. Pharmacol.* 561, 194–201.
- Oller, J., Méndez-Barbero, N., Ruiz, E.J., Villahoz, S., Renard, M., Canelas, L.I., Briones, A.M., Alberca, R., Lozano-Vidal, N., Hurlé, M.A., Milewicz, D., Evangelista, A., Saldañas, M., Nistal, J.F., Jiménez-Borreguero, L.J., De Backer, J., Campanero, M.R., Redondo, J.M., 2017. Nitric oxide mediates aortic disease in mice deficient in the metalloprotease Adamts1 and in a mouse model of Marfan syndrome. *Nat. Med.* 23, 200–212.
- Panday, A., Inda, M.E., Bagam, P., Sahoo, M.K., Osorio, D., Batra, S., 2016. Transcription Factor NF-κB: An Update on Intervention Strategies. *Arch. Immunol. Ther. Exp. (Warsz)*. 64, 463–483.
- Papa, S., Bubici, C., Zazzeroni, F., Franzoso, G., 2009. Mechanisms of liver disease: cross-talk between the NF-kappaB and JNK pathways. *Biol. Chem.* 390, 965–76.
- Pascutti, M.F., Pitashny, M., Nocito, A.L., Guermónprez, P., Amigorena, S., Wietzerbin, J., Serra, E., Bottasso, O., Revelli, S., 2004. Benzimidazole, a drug used in Chagas' disease, ameliorates LPS-induced inflammatory response in mice. *Life Sci.* 76, 685–97.
- Pautz, A., Art, J., Hahn, S., Nowag, S., Voss, C., Kleinert, H., 2010. Regulation of the expression of inducible nitric oxide synthase. *Nitric Oxide - Biol. Chem.* 23, 75–93.
- Pays, J.-F., 2016. The third and new face of Chagas disease. *Bull. Soc. Pathol. Exot.* 109,

139–42.

- Pazienza, V., Vinciguerra, M., Mazzoccoli, G., 2012. PPARs signaling and cancer in the gastrointestinal system. *PPAR Res.* 2012.
- Penas, F., Mirkin, G.A., Hovsepian, E., Cevey, Á., Caccuri, R., Sales, M.E., Goren, N.B., 2013. PPAR γ ligand treatment inhibits cardiac inflammatory mediators induced by infection with different lethality strains of *Trypanosoma cruzi*. *Biochim. Biophys. Acta - Mol. Basis Dis.* 1832, 239–248.
- Penas, F., Mirkin, G.A., Vera, M., Cevey, Á.C., González, C.D., Gómez, M.I., Sales, M.E., Goren, N.B., 2015. Treatment in vitro with PPAR α and PPAR γ ligands drives M1-to-M2 polarization of macrophages from *T. cruzi*-infected mice. *Biochim. Biophys. Acta* 1852, 893–904.
- Penas, F.N., Carta, D., Dmytrenko, G., Mirkin, G.A., Modenutti, C.P., Cevey, Á.C., Rada, M.J., Ferlin, M.G., Sales, M.E., Goren, N.B., 2017. Treatment with a New Peroxisome Proliferator-Activated Receptor Gamma Agonist, Pyridinecarboxylic Acid Derivative, Increases Angiogenesis and Reduces Inflammatory Mediators in the Heart of *Trypanosoma cruzi*-Infected Mice. *Front. Immunol.* 8.
- Penas, F.N., Cevey, Á.C., Siffo, S., Mirkin, G.A., Goren, N.B., 2016. Hepatic injury associated with *Trypanosoma cruzi* infection is attenuated by treatment with 15-deoxy- $\Delta^{12,14}$ prostaglandin J₂. *Exp. Parasitol.* 170.
- Pennington, P.M., Juárez, J.G., Arrivillaga, M.R., De Urioste-Stone, S.M., Doktor, K., Bryan, J.P., Escobar, C.Y., Córdón-Rosales, C., 2017. Towards Chagas disease elimination: Neonatal screening for congenital transmission in rural communities. *PLoS Negl. Trop. Dis.* 11, e0005783.
- Perez-Mazliah, D.E., Alvarez, M.G., Cooley, G., Lococo, B.E., Bertocchi, G., Petti, M., Albareda, M.C., Armenti, A.H., Tarleton, R.L., Laucella, S.A., Viotti, R., 2013. Sequential combined treatment with allopurinol and benznidazole in the chronic phase of *Trypanosoma cruzi* infection: A pilot study. *J. Antimicrob. Chemother.* 68, 424–437.
- Pérez-Molina, J.A., Molina, I., 2017. Chagas disease. *Lancet* 6736, 1–13.
- Pérez-Molina, J.A., Pérez-Ayala, A., Moreno, S., Fernández-González, M.C., Zamora, J., López-Velez, R., 2009. Use of benznidazole to treat chronic Chagas' disease: a

- systematic review with a meta-analysis. *J. Antimicrob. Chemother.* 64, 1139–47.
- PETRAY, P., ROTTENBERG, M.E., GRINSTEIN, S., ÖRN, A., 1994. Release of nitric oxide during the experimental infection with *Trypanosoma cruzi*. *Parasite Immunol.* 16, 193–199.
- Pharaon, L.F., El-Orabi, N.F., Kunhi, M., Al Yacoub, N., Awad, S.M., Poizat, C., 2017. Rosiglitazone promotes cardiac hypertrophy and alters chromatin remodeling in isolated cardiomyocytes. *Toxicol. Lett.* 280, 151–158.
- Piaggio, E., Sancéau, J., Revelli, S., Bottasso, O., Wietzerbin, J., Serra, E., Sanceau, J., Revelli, S., Bottasso, O., Wietzerbin, J., Serra, E., 2001. Trypanocidal Drug Benznidazole Impairs Lipopolysaccharide Induction of Macrophage Nitric Oxide Synthase Gene Transcription Through Inhibition of NF- κ B Activation. *J. Immunol.* 167, 3422–3426.
- Pinto, A.Y.D.N., Valente, S.A., Valente, V.D.C., Ferreira, A.G., Coura, J.R., 2008. Fase aguda da doença de Chagas na Amazônia brasileira. Estudo de 233 casos do Pará, Amapá e Maranhão observados entre 1988 e 2005. *Rev. Soc. Bras. Med. Trop.* 41, 602–614.
- Poveda, C., Fresno, M., Gironès, N., Martins-Filho, O.A., Ramírez, J.D., Santi-Rocca, J., Marin-Neto, J.A., Morillo, C.A., Rosas, F., Guhl, F., 2014. Cytokine profiling in chagas disease: Towards understanding the association with infecting *Trypanosoma cruzi* discrete typing units (A benefit trial sub-study). *PLoS One* 9, 1–8.
- Qian, Z., Gelzer-Bell, R., Yang Sx, S.X., Cao, W., Ohnishi, T., Wasowska, B.A., Hruban, R.H., Rodriguez, E.R., Baldwin, W.M., Lowenstein, C.J., 2001. Inducible nitric oxide synthase inhibition of weibel-palade body release in cardiac transplant rejection. *Circulation* 104, 2369–75.
- Rakhshandehroo, M., Knoch, B., Müller, M., Kersten, S., 2010. Peroxisome Proliferator-Activated Receptor Alpha Target Genes. *PPAR Res.* 2010, 1–20.
- Rassi, A., Little, W.C., Rassi, A.G., Rassi, G.G., Hasslocher-moreno, A., Sousa, A.S., 2006. Development and Validation of a Risk Score for Predicting Death in Chagas' Heart Disease. *N. Engl. J. Med.* 355, 799–808.
- Rassi, A., Rassi, A., Marin-Neto, J.A., 2010. Chagas disease. *Lancet* 375, 1388–1402.

- Reis, M.M., Higuchi, M. de L., Aiello, V.D., Benvenuti, L.A., 2000. [Growth factors in the myocardium of patients with chronic chagasic cardiomyopathy]. *Rev. Soc. Bras. Med. Trop.* 33, 509–18.
- Revelli, S., Le Page, C., Piaggio, E., Wietzerbin, J., Bottasso, O., 1999. Benznidazole, a drug employed in the treatment of Chagas' disease, down-regulates the synthesis of nitrite and cytokines by murine stimulated macrophages. *Clin. Exp. Immunol.* 118, 271–7.
- Revollo, S., Oury, B., Laurent, J., Barnabe, C., Quesney, V., Tibayrenc, M., 1998. *Trypanosoma cruzi*: Impact of Clonal Evolution of the Parasite on Its Biological and Medical Properties 39, 30–39.
- Riarte, A.R., 2015. Etiologic Treatment With Benznidazole in Adult Patients With Chronic Chagas Disease. A Randomized Double Blind Clinical Trial [Página Web]. NIH Clin. Trials. URL: <https://clinicaltrials.gov/ct2/show/study/NCT02386358>
- Ribeiro, A.L., Nunes, M.P., Teixeira, M.M., Rocha, M.O.C., 2012. Diagnosis and management of Chagas disease and cardiomyopathy. *Nat. Rev. Cardiol.* 9, 576–589.
- Robbins, S., Cotran, R., 2006. Corazón. In: Elsevier (Ed.), *Patología Estructural Y Funcional*.
- Rodrigues, D.B.R., Dos Reis, M.A., Romano, A., Pereira, S.A.D.L., Teixeira, V.D.P.A., Tostes Junior, S., Rodrigues, V., 2012. In situ expression of regulatory cytokines by heart inflammatory cells in chagas' disease patients with heart failure. *Clin. Dev. Immunol.* 2012.
- Ronco, M.T., Manarin, R., Francés, D., Serra, E., Revelli, S., Carnovale, C., 2011. Benznidazole treatment attenuates liver NF- κ B activity and MAPK in a cecal ligation and puncture model of sepsis. *Mol. Immunol.* 48, 867–73.
- Rosadini, C. V., Kagan, J.C., 2017. Early innate immune responses to bacterial LPS. *Curr. Opin. Immunol.* 44, 14–19.
- Rueda, K., Trujillo, J.E., Carranza, J.C., Vallejo, G.A., 2014. Transmisión oral de *Trypanosoma cruzi*: un nuevo escenario epidemiológico de la enfermedad de Chagas en Colombia y otros países suramericanos. *Biomédica* 34, 631–641.
- Sahn, D.J., DeMaria, A., Kisslo, J., Weyman, A., 1978. Recommendations regarding

- quantitation in M-mode echocardiography: results of a survey of echocardiographic measurements. *Circulation* 58, 1072–83.
- Sanmarco, L.M., Ponce, N.E., Visconti, L.M., Eberhardt, N., Theumer, M.G., Minguez, Á.R., Aoki, M.P., 2017. IL-6 promotes M2 macrophage polarization by modulating purinergic signaling and regulates the lethal release of nitric oxide during *Trypanosoma cruzi* infection. *Biochim. Biophys. Acta - Mol. Basis Dis.* 1863, 857–869.
- Santa-Rita, R.M., Lira, R., Barbosa, H.S., Urbina, J.A., de Castro, S.L., 2005. Anti-proliferative synergy of lysophospholipid analogues and ketoconazole against *Trypanosoma cruzi* (Kinetoplastida: Trypanosomatidae): Cellular and ultrastructural analysis. *J. Antimicrob. Chemother.* 55, 780–784.
- Santos, F.M., Mazzeti, A.L., Caldas, S., Gonçalves, K.R., Lima, W.G., Torres, R.M., Bahia, M.T., 2016. Chagas cardiomyopathy: The potential effect of benznidazole treatment on diastolic dysfunction and cardiac damage in dogs chronically infected with *Trypanosoma cruzi*. *Acta Trop.* 161, 44–54.
- Schmittgen, T.D., Livak, K.J., 2008. Analyzing real-time PCR data by the comparative C(T) method. *Nat. Protoc.* 3, 1101–8.
- Schmunis, G.A., Yadon, Z.E., 2010. Chagas disease: A Latin American health problem becoming a world health problem. *Nature* 465, S6–S7.
- Sekaran, N.K., Crowley, A.L., de Souza, F.R., Resende, E.S., Rao, S. V., 2017. The Role for Cardiovascular Remodeling in Cardiovascular Outcomes. *Curr. Atheroscler. Rep.* 19.
- Shen, W., Gao, Y., Lu, B., Zhang, Q., Hu, Y., Chen, Y., 2014. Negatively regulating TLR4/NF- κ B signaling via PPAR α in endotoxin-induced uveitis. *Biochim. Biophys. Acta - Mol. Basis Dis.* 1842, 1109–1120.
- Singh, S., Loke, Y.K., Furberg, C.D., 2015. Long-term Risk of Cardiovascular Events. *J. Am. Med. Assoc.* 298, 1189–1195.
- Sociedad Argentina de Protozoología, 2016. Sociedad Argentina de Protozoología. In: Libro de Resúmenes XXVIII Reunión Anual de La Sociedad Argentina de Protozoología Y Enfermedades Parasitarias - SIMPOSIO Internacional de Biología Celular Y Molecular de La Enfermedad de Chagas. p. 13.

- Soriano-Arandes, A., Angheben, A., Serre-Delcor, N., Treviño-Maruri, B., Gomez i Prat, J., Jackson, Y., 2016. Control and management of congenital Chagas disease in Europe and other non-endemic countries : current policies and practices 0, 1–7.
- Sugga, G.S., Khanam, R., Khan, M.U., Khanam, R., 2012. Protective role of fibrates in cardiac ischemia/reperfusion. *J. Adv. Pharm. Technol. Res.* 3, 188.
- Sun, S.C., 2017. The non-canonical NF- κ B pathway in immunity and inflammation. *Nat. Rev. Immunol.* 17, 545–558.
- Suto, Y., Nakajima-Shimada, J., Yamagiwa, N., Onizuka, Y., Iwasaki, G., 2015. Synthesis and biological evaluation of quinones derived from natural product komaroviquinone as anti-*Trypanosoma cruzi* agents. *Bioorganic Med. Chem. Lett.* 25, 2967–2971.
- Tanowitz, H.B., Machado, F.S., Jelicks, L.A., Shirani, J., Campos de Carvalho, A.C., Spray, D.C., Factor, S.M., Kirchhoff, L. V., Weiss, L.M., 2009. Perspectives on *Trypanosoma cruzi*-Induced Heart Disease (Chagas Disease). *Prog. Cardiovasc. Dis.* 51, 524–539.
- Tanowitz, H.B., Machado, F.S., Spray, D.C., Friedman, J.M., Weiss, O.S., Lora, J.N., Nagajyothi, J., Moraes, D.N., Garg, N.J., Nunes, M.C.P., Ribeiro, A.L.P., Oren, S., Lora, J.N., Nagajyothi, J., Moraes, D.N., Garg, N.J., Nunes, C.P., Ribeiro, A.L.P., Weiss, O.S., Lora, J.N., Nagajyothi, J., Moraes, D.N., Garg, N.J., Nunes, M.C.P., Ribeiro, A.L.P., 2015. Developments in the management of Chagas cardiomyopathy. *Expert Rev. Cardiovasc. Ther.* 9072, 1–17.
- Tarleton, R.L., 2007. Immune system recognition of *Trypanosoma cruzi*. *Curr. Opin. Immunol.* 19, 430–434.
- Tomasini, N., Ragone, P.G., Gourbière, S., Aparicio, J.P., Diosque, P., Cohen, J., 2017. Epidemiological modeling of *Trypanosoma cruzi*: Low stercorarian transmission and failure of host adaptive immunity explain the frequency of mixed infections in humans. *PLOS Comput. Biol.* 13, e1005532.
- Trachtenberg, B.H., Hare, J.M., 2017. Inflammatory Cardiomyopathic Syndromes. *Circ. Res.* 121, 803–818.
- Traina, M., Meymandi, S., Bradfield, J.S., 2016. Heart Failure Secondary to Chagas Disease: an Emerging Problem in Non-endemic Areas. *Curr. Heart Fail. Rep.* 13,

- 295–301.
- Trevani, A., Zwirner, N., Geffner, J., Fainboim, L., 2009. Inmunidad innata: neutrófilos, macrófagos y células natural killer. In: *Introducción a La Inmunología Humana*. Editorial Médica Panamericana S.A, pp. 51–88.
- Trypanosoma cruzi Genome Initiative, 2000. Trypanosoma cruzi Genome Initiative [Página Web]. Trypanos. cruzi Genome Initiat. URL: <http://www.dbbm.fiocruz.br/TcruziDB/strain.html>
- van Delft, M.A.M., Huitema, L.F.A., Tas, S.W., 2015. The contribution of NF- κ B signalling to immune regulation and tolerance. *Eur. J. Clin. Invest.* 45, 529–539.
- Van Tassel, B.W., Seropian, I.M., Toldo, S., Mezzaroma, E., Abbate, A., 2013. Interleukin-1 β induces a reversible cardiomyopathy in the mouse. *Inflamm. Res.* 62, 637–640.
- Veldhoen, M., Hocking, R.J., Flavell, R.A., Stockinger, B., 2006. Signals mediated by transforming growth factor- β initiate autoimmune encephalomyelitis, but chronic inflammation is needed to sustain disease. *Nat. Immunol.* 7, 1151–1156.
- Vilar-Pereira, G., Carneiro, V.C., Mata-Santos, H., Vicentino, A.R.R., Ramos, I.P., Giarola, N.L.L., Feijó, D.F., Meyer-Fernandes, J.R., Paula-Neto, H.A., Medei, E., Bozza, M.T., Lannes-Vieira, J., Paiva, C.N., 2016a. Resveratrol Reverses Functional Chagas Heart Disease in Mice. *PLoS Pathog.* 12, e1005947.
- Vilar-Pereira, G., Resende Pereira, I., de Souza Ruivo, L.A., Cruz Moreira, O., da Silva, A.A., Britto, C., Lannes-Vieira, J., 2016b. Combination Chemotherapy with Suboptimal Doses of Benznidazole and Pentoxifylline Sustains Partial Reversion of Experimental Chagas' Heart Disease. *Antimicrob. Agents Chemother.* 60, 4297–4309.
- Viotti, R., Vigliano, C., Laucella, S., Lococo, B., Petti, M., Bertocchi, G., Ruiz Vera, B., Armenti, H., 2004. Value of echocardiography for diagnosis and prognosis of chronic Chagas disease cardiomyopathy without heart failure. *Heart* 90, 655–660.
- Viotti, R., Vigliano, C., Lococo, B., Alvarez, M.G., Petti, M., Bertocchi, G., Armenti, A., 2009. Side effects of benznidazole as treatment in chronic Chagas disease: fears and realities. *Expert Rev. Anti. Infect. Ther.* 7, 157–63.
- Viotti, R., Vigliano, C., Lococo, B., Bertocchi, G., Petti, M., Alvarez, M.G., Postan, M.,

- Armenti, A., 2006. Long-term cardiac outcomes of treating chronic Chagas disease with benznidazole versus no treatment: a nonrandomized trial. *Ann. Intern. Med.* 144, 724–34.
- Vitelli-Avelar, D.M., Sathler-Avelar, R., Dias, J.C.P., Pascoal, V.P.M., Teixeira-Carvalho, A., Lage, P.S., Elói-Santos, S.M., Corrêa-Oliveira, R., Martins-Filho, O.A., 2005. Chagasic patients with indeterminate clinical form of the disease have high frequencies of circulating CD3 +CD16 -CD56 + natural killer T cells and CD4 +CD25 High regulatory T lymphocytes. *Scand. J. Immunol.* 62, 297–308.
- Vitt, J.P., Saunders, A.B., O'Brien, M.T., Mansell, J., Ajithdoss, D.K., Hamer, S.A., 2016. Diagnostic Features of Acute Chagas Myocarditis with Sudden Death in a Family of Boxer Dogs. *J. Vet. Intern. Med.* 30, 1210–1215.
- Vogt, J., Alba Soto, C.D., Mincz, M.P., Mirkin, G.A., 2008. Impaired Trypanosoma cruzi-specific IFN- γ secretion by T cells bearing the BV9 T-cell receptor is associated with local IL-10 production in non-lymphoid tissues of chronically infected mice. *Microbes Infect.* 10, 781–790.
- Watanabe, K., Fujii, H., Takahashi, T., Kodama, M., Aizawa, Y., Ohta, Y., Ono, T., Hasegawa, G., Naito, M., Nakajima, T., Kamijo, Y., Gonzalez, F.J., Aoyama, T., 2000. Constitutive regulation of cardiac fatty acid metabolism through peroxisome proliferator-activated receptor alpha associated with age-dependent cardiac toxicity. *J. Biol. Chem.* 275, 22293–22299.
- Wen, J.-J., Porter, C., Garg, N.J., 2017. Inhibition of NFE2L2-ARE pathway by mitochondrial ROS contributes to development of cardiomyopathy and left ventricular dysfunction in Chagas disease. *Antioxid. Redox Signal.* 7, ars.2016.6831.
- WHO - World Health Organization, 2010. First WHO report on neglected tropical diseases: Working to overcome the global impact of neglected tropical diseases First WHO report on neglected tropical diseases [Página Web]. URL: http://www.who.int/neglected_diseases/2010report/en/
- WHO - World Health Organization, 2017. WHO | Chagas disease (American trypanosomiasis) [Página Web]. WHO. URL: <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs340/en/> (2.22.16).

- Xavier, S.S., Sousa, A.S., Brasil, P.E.A.A., Gabriel, F.G., Holanda, M.T., Hasslocher-Moreno, A., 2005. Apical aneurysm in the chronic phase of Chagas disease: prevalence and prognostic value in an urban cohort of 1053 patients. *Rev SOCERJ* 18, 351–6.
- Xu, H.E., Stanley, T.B., Montana, V.G., Lambert, M.H., Shearer, B.G., Cobb, J.E., McKee, D.D., Galardi, C.M., Plunket, K.D., Nolte, R.T., Parks, D.J., Moore, J.T., Kliewer, S.A., Willson, T.M., Stimmel, J.B., 2002. Structural basis for antagonist-mediated recruitment of nuclear co-repressors by PPARalpha. *Nature* 415, 813–7.
- Yin, W.-H., Chen, J.-W., Chen, Y.-H., Lin, S.-J., 2013. Fenofibrate Modulates HO-1 and Ameliorates Endothelial Expression of Cell Adhesion Molecules in Systolic Heart Failure. *Acta Cardiol. Sin.* 29, 251–60.
- Zaidenberg, A., Luong, T., Lirussi, D., Bleiz, J., Del Buono, M.B., Quijano, G., Drut, R., Kozubsky, L., Marron, A., Buschiazzo, H., 2006. Treatment of experimental chronic chagas disease with trifluralin. *Basic Clin. Pharmacol. & Toxicology* 98, 351–356.
- Zhang, J., Cheng, Y., Gu, J., Wang, S., Zhou, S., Wang, Y., Tan, Y., Feng, W., Fu, Y., Mellen, N., Cheng, R., Ma, J., Zhang, C., Li, Z., Cai, L., 2016. Fenofibrate increases cardiac autophagy via FGF21/SIRT1 and prevents fibrosis and inflammation in the hearts of Type 1 diabetic mice. *Clin. Sci.* 130, 625–641.
- Zhang, N., Chu, E.S.H., Zhang, J., Li, X., Liang, Q., Chen, J., Chen, M., Teoh, N., Farrell, G., Sung, J.J.Y., Yu, J., 2014. Peroxisome proliferator activated receptor alpha inhibits hepatocarcinogenesis through mediating NF-κB signaling pathway. *Oncotarget* 5, 8330–40.
- Zhang, Y., Bauersachs, J., Langer, H., 2017. Immune Mechanisms in Heart Failure. *Eur. J. Heart Fail.* 1–11.
- Zingales, B., 2017. Trypanosoma cruzi genetic diversity: Something new for something known about Chagas disease manifestations, serodiagnosis and drug sensitivity. *Acta Trop.*
- Zingales, B., Andrade, S.G., Briones, M.R.S., Campbell, D.A., Chiari, E., Fernandes, O., Guhl, F., Lages-Silva, E., Macedo, A.M., Machado, C.R., Miles, M.A., Romanha, A.J., Sturm, N.R., Tibayrenc, M., Schijman, A.G., 2009. A new consensus for Trypanosoma cruzi intraspecific nomenclature: second revision meeting

- recommends TcI to TcVI. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz* 104, 1051–4.
- Zou, J., Le, K., Xu, S., Chen, J., Liu, Z., Chao, X., Geng, B., Luo, J., Zeng, S., Ye, J., Liu, P., 2013. Fenofibrate ameliorates cardiac hypertrophy by activation of peroxisome proliferator-activated receptor- α partly via preventing p65-NF κ B binding to NFATc4. *Mol. Cell. Endocrinol.* 370, 103–112.
- Zuo, N., Zheng, X., Liu, H., Ma, X., 2015. Fenofibrate, a PPAR α agonist, protect proximal tubular cells from albumin-bound fatty acids induced apoptosis via the activation of NF- κ B. *Int. J. Clin. Exp. Pathol.* 8, 10653–61.