

UNIVERSIDAD DE CHILE  
FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS Y FARMACÉUTICAS  
ESCUELA DE POSTGRADO



**Efecto de aspirina y su combinación con benznidazol  
sobre el desarrollo de la cardiomiopatía Chagásica, en un  
modelo murino.**

TESIS PARA OPTAR AL GRADO DE DOCTOR EN FARMACOLOGÍA

**ALFREDO ENRIQUE MOLINA BERRÍOS**

**Director de Tesis:**

Dr. Juan Diego Maya Arango

Programa de Farmacología Molecular y Clínica  
ICBM, Facultad de Medicina. Universidad de Chile

**Co-directores:**

María Eugenia Letelier Muñoz

Antonio Morello Casté

Departamento de Química Farmacológica y  
Toxicológica. Facultad de Ciencias Químicas y  
Farmacéuticas. Universidad de Chile

Programa de Farmacología Molecular y  
Clínica. ICBM, Facultad de Medicina.  
Universidad de Chile

**SANTIAGO, 2012**

***“Lo importante no es llegar, lo importante es el camino”***

Al amor de mi vida, Luisa y a mi hijo, Santiago.

## AGRADECIMIENTOS

*Quiero agradecer a mi papá, mamá y hermana por apoyarme siempre. Esto fue posible gracias a ustedes. Los amo.*

*Muy especialmente a la profesora María Eugenia Letelier, quien ha sido parte fundamental de mi desarrollo como futuro académico y también como un profesional con un norte bien claro: aportar no sólo desde el conocimiento sino también desde la experiencia. Este triunfo también es de usted profesora y se lo dedico con todo el cariño que usted ya sabe que le tengo. Un abrazo gigante!*

*Debo agradecer de sobremanera al Doctor Juan Diego Maya. Siempre fue más que un Director de tesis y siempre conté con su ayuda y consejo, tanto académico como personal, aún cuando el tiempo era escaso y el trabajo agobiante. Estoy seguro que eso no lo pueden decir todos los tesisistas de doctorado y por lo mismo estoy muy agradecido.*

*Al Doctor Antonio Morello, le agradezco sus críticas y comentarios sobre esta tesis, experimentos, academia y más importante aún, la vida cotidiana. Ha sido muy importante para mí haber pasado por este laboratorio y contar con su experiencia para la realización de mi tesis y mi formación como doctor y futuro académico.*

*A la Doctora Ulrike Kemmerling, usted fue imprescindible para la realización de esta tesis. Muchas gracias de verdad por todo el apoyo y guía que recibí de parte suya y también de su grupo de laboratorio.*

*Doctor Rodrigo "lupin", mi estadía en el laboratorio no hubiera sido lo mismo si no hubiera contado con tu buena onda. Tantas conversaciones, planes maléficis y proyectos que han surgido entre pipeteo y pipeteo. Gané un gran amigo en estos años, un abrazo.*

*A los académicos de la comisión revisora de este trabajo, sus comentarios y observaciones siempre fueron de ayuda para la realización de esta tesis. Muchas gracias por su excelente disposición y tiempo.*

*Al Señor Juan Rivas, Enrique Moraga y Jorge Leiva. Gracias por su excelente trato, disposición y ayuda para mi trabajo en el laboratorio.*

*También agradezco a todos los que de alguna manera formaron parte directa o indirectamente de esta tesis durante estos 5 años. Al Doctor Jorge Ferreira, cuyas conversaciones siempre fueron de gran aporte para mi tesis. A Los "Chagásicos": Juan, Michel Cristian, Gema. Los "Cancerosos": José, Fabián y Liliana. A todos, su ayuda y amistad fue fundamental. Fue muy importante contar con ustedes siempre.*

*Y más allá de las individualidades, a toda esta gente que forma este grupo de investigación. Me siento afortunado de haber llegado a este grupo de trabajo, con gran calidad humana y un increíble sentido del humor.*

*Finalmente a mi familia: Luisa y Santiago. Ustedes son mi motivación y mi norte para cada una de las cosas que hago. Gracias por hacerme feliz. Los amo!!*

*El desarrollo de esta tesis doctoral fue posible gracias al financiamiento de los proyectos FONDECYT 1090078 y Proyecto ANILLO ACT112, CONICYT.*

## INDICE GENERAL

<b>CONTENIDO</b>	<b>PÁGINA</b>
<b>ÍNDICE DE FIGURAS Y TABLAS</b> .....	<b>vi</b>
<b>RESUMEN</b> .....	<b>viii</b>
<b>SUMARY</b> .....	<b>xi</b>
<b>I. INTRODUCCIÓN</b> .....	<b>1</b>
Ciclo Biológico de la infección.....	<b>1</b>
Epidemiología de la enfermedad de Chagas.....	<b>2</b>
Aspectos clínicos de la enfermedad de Chagas.....	<b>4</b>
Patogénesis.....	<b>6</b>
Disfunción endotelial en el desarrollo de la cardiomiopatía chagásica crónica.....	<b>9</b>
Rol de los prostanoides en el desarrollo de la disfunción endotelial y CCC: Tromboxano A2 (TXA2) y prostaglandinas.....	<b>11</b>
Tratamiento etiológico de la enfermedad de Chagas.....	<b>14</b>
Terapia antichagásica en la cardiomiopatía chagásica crónica.....	<b>15</b>
<b>HIPÓTESIS</b> .....	<b>18</b>
<b>OBJETIVO GENERAL</b> .....	<b>18</b>
<b>OBJETIVOS ESPECÍFICOS</b> .....	<b>18</b>
<b>II. MATERIALES Y MÉTODOS</b> .....	<b>20</b>
Animales.....	<b>20</b>
Modelo de infección crónica.....	<b>20</b>
Tratamientos farmacológicos de los animales.....	<b>21</b>
Parasitemias y sobrevida.....	<b>21</b>
Técnicas histológicas.....	<b>22</b>
Niveles plasmáticos de marcadores de disfunción endotelial.....	<b>23</b>
Determinación del tiempo de sangrado.....	<b>23</b>

Determinación de material genético de <i>T. cruzi</i> en sangre y tejidos mediante PCR convencional.....	23
Análisis estadístico.....	24
<b>III. RESULTADOS.....</b>	<b>25</b>
<b>ESTABLECIMIENTO DEL MODELO DE INFECCIÓN CRÓNICA.....</b>	<b>25</b>
Parasitemia.....	25
Sobrevida.....	26
Presencia de DNA de <i>T. cruzi</i> en sangre y tejido cardiaco en la etapa crónica de la infección.....	27
Análisis histológico.....	29
<b>TRATAMIENTO FARMACOLÓGICO: ADMINISTRACIÓN DE ASPIRINA (AAS) Y/O BENZNIDAZOL (BZ).....</b>	<b>31</b>
I. Efecto de AAS, Bz y su combinación sobre el curso de la infección en ratones BALB/c.....	32
Parasitemia.....	32
Sobrevida.....	34
Histología del tejido cardiaco.....	36
II. Efecto de AAS, Bz y su combinación sobre el desarrollo de disfunción endotelial en ratones BALB/c infectados con <i>T. cruzi</i> .....	41
Expresión de ICAM-1 en tejido cardiaco.....	41
Niveles plasmáticos de marcadores de disfunción endotelial.....	46
<b>RESUMEN DE RESULTADOS.....</b>	<b>50</b>
<b>IV. DISCUSIÓN.....</b>	<b>54</b>
<b>CONCLUSIONES.....</b>	<b>59</b>
<b>V. REFERENCIAS.....</b>	<b>61</b>

## INDICE DE TABLAS Y FIGURAS

	<b>Página</b>
<b>Figura 1.</b> Ciclo Biológico del <i>Trypanosoma cruzi</i> .....	<b>3</b>
<b>Figura 2.</b> Síntesis de Tromboxano A2 (TXA2) y Prostaglandina E2 (PGE2)....	<b>12</b>
<b>Figura 3.</b> Fármacos antichagásicos: nifurtimox y benznidazol.....	<b>14</b>
<b>Figura 4.</b> Parasitemias y sobrevivencia de ratones BALB/c y C57BL/6 infectados con <i>T. cruzi</i> .....	<b>26</b>
<b>Figura 5.</b> Ausencia de DNA de <i>T. cruzi</i> en sangre de ratones BALB/c y C57BL/6 en la etapa crónica de la infección.....	<b>28</b>
<b>Figura 6.</b> DNA de <i>T. cruzi</i> es detectado sólo en el tejido cardíaco de ratones BALB/c en la etapa crónica de la infección.....	<b>29</b>
<b>Figura 7.</b> Daño cardíaco en ratones BALB/c en la etapa crónica de la infección con <i>T. cruzi</i> .....	<b>30</b>
<b>Figura 8.</b> Aspirina (AAS) no afecta la parasitemia de ratones BALB/c infectados con <i>T. cruzi</i> , mientras que benznidazol (Bz) la disminuye.....	<b>33</b>
<b>Figura 9.</b> Aspirina (AAS) no potencia el efecto de benznidazol (Bz) sobre la parasitemia de ratones BALB/c infectados con <i>T. cruzi</i> .....	<b>34</b>
<b>Figura 10.</b> Aspirina (AAS) no afecta la mortalidad de ratones BALB/c infectados con <i>T. cruzi</i> , mientras que benznidazol (Bz) la disminuye.....	<b>35</b>
<b>Figura 11.</b> Aspirina (AAS) no potencia el efecto de benznidazol (Bz) sobre la mortalidad de ratones BALB/c infectados con <i>T. cruzi</i> .....	<b>36</b>
<b>Figura 12.</b> Efecto modulador de aspirina (AAS) y benznidazol (Bz) sobre el infiltrado inflamatorio y daño cardíaco, en la etapa aguda de la infección con <i>T. cruzi</i> .....	<b>37</b>
<b>Figura 13.</b> Aspirina (AAS) y benznidazol (Bz) previenen el desarrollo de lesiones cardíacas presentes en la etapa crónica de la infección.....	<b>39</b>

<b>Figura 14.</b> Aspirina (AAS) no potencia el efecto preventivo de benznidazol (Bz) sobre el desarrollo de lesiones cardiacas e infiltrado inflamatorio en ratones BALB/c infectados con <i>T. cruzi</i> .....	<b>40</b>
<b>Figura 15.</b> Aspirina (AAS) y benznidazol (Bz) disminuyen la expresión de ICAM-1 en tejido cardiaco durante la etapa aguda de la infección.....	<b>42</b>
<b>Figura 16.</b> Aspirina (AAS) y benznidazol (Bz) previenen el aumento de expresión de ICAM-1 en tejido cardiaco durante la etapa crónica de la infección.....	<b>44</b>
<b>Figura 17.</b> Aspirina (AAS) no potencia el efecto de benznidazol (Bz) sobre la expresión de ICAM-1 en tejido cardiaco durante la etapa aguda y crónica de la infección.....	<b>45</b>
<b>Figura 18.</b> Aspirina (AAS) normaliza el tiempo de sangrado de ratones BALB/c infectados con <i>T. cruzi</i> .....	<b>46</b>
<b>Figura 19.</b> Efecto normalizador de aspirina (AAS), benznidazol (Bz) y su combinación sobre los niveles plasmáticos de marcadores de disfunción endotelial.....	<b>49</b>
<b>Figura 20.</b> Benznidazol y aspirina modulan el desarrollo de la cardiopatía chagásica crónica al prevenir las alteraciones microvasculares asociadas a la disfunción endotelial.....	<b>60</b>
<b>Tabla 1.</b> Parámetros epidemiológicos de la enfermedad de Chagas.....	<b>4</b>

## RESUMEN

La enfermedad de Chagas es causada por el protozoo flagelado *Trypanosoma cruzi* y afecta aproximadamente, a 8 millones de personas en América Latina. Se estima que cerca de 28 millones de personas están en riesgo de contraerla, entre el sur de California en Estados Unidos, hasta la sexta región en Chile. Alrededor del 30% de los pacientes desarrollan la fase crónica de la enfermedad, caracterizada por la llamada cardiomiopatía chagásica, con falla cardíaca y arritmias potencialmente fatales, originando una alta morbilidad en la población afectada. Se ha propuesto que el Tromboxano A2 (TXA2) y la prostaglandina E2 (PGE2) participarían activamente en el desarrollo de las alteraciones presentes en la cardiopatía chagásica. El TXA2 produce activación endotelial al aumentar la expresión de moléculas de adhesión como ICAM-1 y VCAM-1. Este mediador también promueve la activación/agregación y degranulación plaquetaria como parte de su actividad protrombótica. La PGE2, participa en algunos de los mecanismos que el *T. cruzi* utiliza para evadir la respuesta inmune innata y contribuye al remodelamiento cardíaco y a la alteración de la función cardíaca (procesos fibróticos). La síntesis de TXA2 y PGE2 es inhibida por aspirina (AAS) y otros fármacos antiinflamatorios no esteroideos (AINEs). El tratamiento actual de la enfermedad de Chagas, con los nitroderivados nifurtimox, benznidazol (Bz), es efectivo en la fase aguda, pero los efectos adversos de estos fármacos y la diferente susceptibilidad de las distintas cepas de parásitos pueden afectar la terapia. Trabajos preliminares de nuestro laboratorio, mostraron que la aspirina redujo la infección de *T. cruzi* en células RAW 264.7 y presenta un efecto sinérgico con nifurtimox y benznidazol. Asimismo, en un modelo agudo en ratones BALB/c infectados, la aspirina redujo la parasitemia, la extensión de miocarditis y la mortalidad. De acuerdo a estos antecedentes, en este trabajo se estudió el efecto antichagásico de un tratamiento asociado de AAS y Bz en un modelo de infección crónica con *T. cruzi* en ratones BALB/c. Los animales infectados con 500 tripomastigotes de la cepa Dm28c, fueron tratados

con AAS a una dosis antiagregante plaquetaria (2 mg/kg/día) o una dosis antiinflamatoria (40 mg/kg/día) y/o con Bz (30 mg/kg/día o 100 mg/kg/día) durante 20 días. Los ratones infectados desarrollaron altas parasitemias, una mortalidad de un 50% y lesiones características de una cardiomiopatía chagásica. Estos animales además, presentaron una expresión aumentada de ICAM-1 en tejido cardíaco y niveles plasmáticos elevados de TXA<sub>2</sub>, sICAM-1 y sE-selectina, los cuales son reconocidos como marcadores de disfunción endotelial.

Durante la etapa aguda de la infección, el tratamiento con AAS 2 y 40 mg/kg/día, no disminuyó los niveles de parasitemia y sobrevida de los animales infectados con *T. cruzi*. Por otro lado, en el tejido cardíaco de los ratones tratados con AAS, es posible observar una disminución del infiltrado inflamatorio; sin embargo, la presencia de nidos de amastigotes no fue diferente a la del grupo control. Por el contrario, los animales tratados con Bz 30 mg/kg, presentaron bajos niveles de parasitemia y pequeños focos de infiltrado inflamatorio. Este efecto fue superior con la administración de Bz 100 mg/kg/día, ya que estos animales no presentaron parasitemia, ni tampoco se observaron nidos de amastigotes e infiltrado inflamatorio en el tejido cardíaco. Respecto de la sobrevida, ambas dosis de benznidazol fueron igualmente eficaces. Durante la etapa crónica, ambas dosis de AAS como de Bz, disminuyeron las lesiones del tejido cardíaco y la expresión de ICAM-1. Respecto de los niveles plasmáticos de marcadores de disfunción endotelial, AAS 2 y 40 mg/kg normalizó los niveles sICAM-1 y TXA<sub>2</sub>. De manera similar, ambas dosis de Bz disminuyeron los niveles plasmáticos de estos marcadores. Los resultados de los estudios de combinación mostraron que la adición de AAS 2 o 40 mg/kg a los animales tratados con Bz 30 mg/kg, no aumenta el efecto de Bz sobre los marcadores de disfunción endotelial.

En conclusión, en nuestro modelo de infección, si bien el tratamiento con AAS 2 y 40 mg/kg es capaz de prevenir las lesiones cardíacas características de la fase crónica, no

presenta los efectos tripanocidas observados con ambas dosis de Bz. Por otro lado, la combinación de AAS y Bz no mostró efecto superior sobre parasitemias, mortalidad y presencia de amastigotes en el tejido cardíaco, cuando se compara con los animales que recibieron sólo Bz 30 mg/kg. Más aún, el tratamiento sólo con Bz 30 mg/kg/día moduló la inflamación cardíaca y el desarrollo de disfunción endotelial, efectos que tampoco fueron mejorados con la combinación con AAS 2 o 40 mg/kg/día.

## SUMMARY

Chagas' disease, caused by the flagellated protozoa *Trypanosoma cruzi*, affects 8 million people in Latin America. It has been estimated that 28 million people are at risk to get infected, from south California in United States, to sixth region in Chile. Approximately, 30% of patients develop the chronic phase of the disease, characterized by the Chronic Chagasic Cardiomyopathy, with heart failure and severe/fatal arrhythmias, originating a high morbidity in affected population. It has been proposed that Thromboxane A<sub>2</sub> (TXA<sub>2</sub>) and Prostaglandin E<sub>2</sub> (PGE<sub>2</sub>) participate actively in the development of cardiac alterations in the chronic phase. TXA<sub>2</sub> activates the endothelium by increasing cellular adhesion molecules expression, such as ICAM-1 and VCAM-1. This mediator promotes also the platelet activation/aggregation and degranulation as part of its pro-thrombotic activity. PGE<sub>2</sub> participates in some of the mechanisms that *T. cruzi* uses to avoid innate immune response and contribute to cardiac remodeling and functional alterations (fibrosis). Synthesis of TXA<sub>2</sub> and PGE<sub>2</sub> is inhibited by aspirin (ASA) and other non-steroidal anti-inflammatory drugs (NSAIDs). Current Chagas' disease treatment, with the nitroderivatives nifurtimox or benznidazol (Bz), is effective in acute phase of the disease, but therapy is highly compromised by adverse effects related to these drugs and the variable susceptibility of different *T. cruzi* strains to antichagasics.

Preliminary work from our group shows that ASA reduced *T. cruzi* infection in RAW 264.7 cells and elicited a synergistic effect with nifurtimox and Bz. In a similar way, ASA reduced parasitemia, myocarditis and mortality, in an acute infection model in BALB/c mice. According with this information, in this work we studied the antichagasic effect of ASA and Bz treatment in a model of chronic infection with *T. cruzi* in BALB/c mice. Animals infected with 500 trypomastigotes of Dm28c strain, were treated with ASA using an antiplatelet dose (2 mg/kg/day) or a higher dose as anti-inflammatory (40

mg/kg/day) and/or with Bz (30 mg/kg/day or 100 mg/kg/day) for 20 days. Infected mice developed high parasitemia, 50% mortality and characteristic lesions of chagasic cardiopathy. In addition, these animals presented augmented expression of ICAM-1 in cardiac tissue and elevated plasma levels of TXA2, sICAM-1 and sE-selectin, which are recognized endothelial dysfunction markers.

During acute phase of infection, treatment with ASA 2 and 40 mg/kg/day did not decrease parasitemia levels and mortality of infected animals. On the other hand, the cardiac tissue obtained from ASA treated animals presented diminished inflammatory infiltrate; however, amastigote nests were still present in the infected control group. Conversely, Bz 30 mg/kg/day treated animals, presented low levels of parasitemia and small and focalized inflammatory infiltrates. This effect was higher with Bz 100 mg/kg administration, since in these animals parasitemia, inflammatory infiltrate and amastigote nests were not detected. Respect to survival, both Bz doses were equally effective. During chronic phase, treatment with ASA and Bz were able to prevent the cardiac lesions and ICAM-1 expression. Regarding to plasma levels of dysfunction endothelial markers, ASA 2 and 40 mg/kg normalized sICAM-1 and TXA2 levels. In a similar way, both Bz doses decreased plasma levels of these markers.

In the drugs combination studies, the addition of ASA 2 mg/kg or 40 mg/kg to Bz 30 mg/kg treatment, did not potentiate the Bz effects.

In conclusion, in our chronic infection model, administration of ASA 2 mg/kg and 40 mg/kg prevented chronic cardiac lesions, but these treatments did not present trypanocidal effects as observed with Bz. On the other hand, combination of ASA with Bz showed no superior effect on parasitemia, mortality and amastigote nests presence as compared with Bz treated animals. Moreover, Bz 30 mg/kg/day administration modulates cardiac inflammation and the development of endothelial dysfunction, effects that were not improved with AAS 2 mg/kg or 40 mg/kg.

## I. INTRODUCCIÓN

La enfermedad de Chagas o Tripanosomiasis Americana, es causada por el protozoo flagelado *Trypanosoma cruzi*, cuyo ciclo de infección involucra un mamífero como hospedero y un insecto hematófago como vector (triatominos). En Chile, el vector principal es el *Triatoma infestans*, popularmente conocido como “vinchuca”. Otras formas de transmisión de la infección incluyen transfusiones sanguíneas, trasplante de órganos, transmisión congénita y excepcionalmente, mediante la ingesta de alimentos contaminados.

En muchos pacientes, la infección puede pasar desapercibida o puede desarrollar síntomas agudos. En la mayoría de los casos, esta infección se resuelve de forma espontánea. Sin embargo, entre los individuos infectados de forma crónica, el 30-40% desarrollan la enfermedad crónica sintomática, caracterizada por las formas gastrointestinales (megaesófago y megacolon) y/o cardíacas (cardiomiopatía chagásica), con una alta morbilidad (Rassi et al., 2012; Muñoz-Saravia et al., 2012).

### **Ciclo Biológico de la Infección**

El *Trypanosoma cruzi* existe en tres estados morfológicos: tripomastigotes, epimastigotes y amastigotes; cada uno de los cuales representa las diferentes fases de su ciclo de vida (Figura 1). El ciclo biológico de la infección comienza cuando el triatomino infectado se alimenta de sangre y libera tripomastigotes en sus heces cerca del sitio de la picadura. Los parásitos depositados pueden ingresar al hospedero por esta vía o mucosas como la conjuntiva. Una vez en el hospedero, los tripomastigotes invaden inicialmente células macrofágicas, dentro de las cuales se diferencian a amastigotes. Esta forma replicativa intracelular se divide durante varios ciclos para

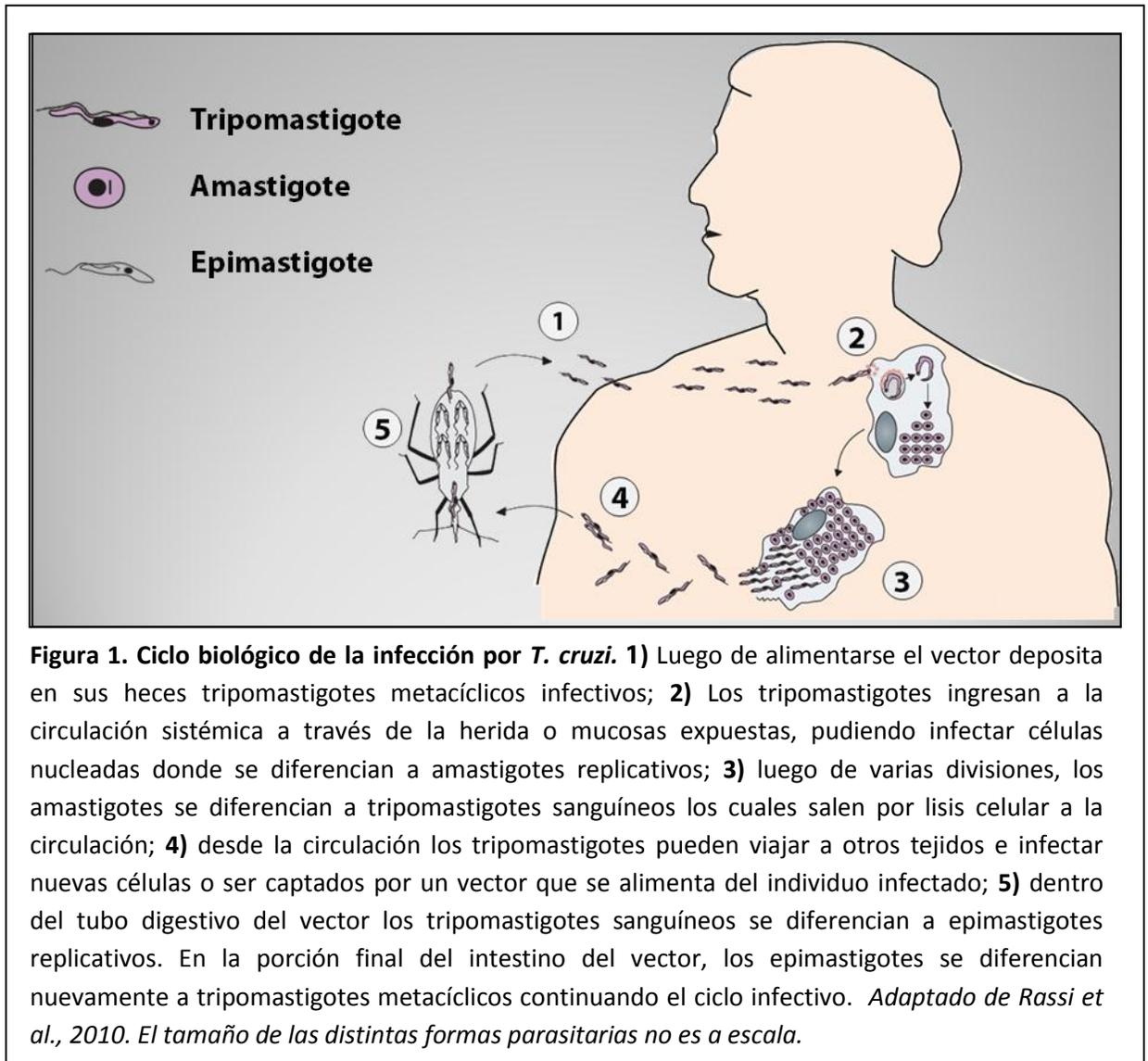
luego diferenciarse a tripomastigotes, los que son liberados, mediante la lisis de la célula infectada, a la circulación como tripomastigotes sanguíneos. Los tripomastigotes pueden invadir prácticamente cualquier célula nucleada de variados tejidos y así transformarse nuevamente en amastigotes para seguir su replicación. Posteriormente, la infección puede transmitirse a un nuevo vector, cuando el triatomino se alimenta de sangre que contiene parásitos circulantes. Dentro del tracto digestivo del triatomino, los tripomastigotes sanguíneos ingeridos se diferencian a epimastigotes, los que se multiplican en la primera porción del intestino para luego diferenciarse a tripomastigotes metacíclicos infectivos en la porción final del intestino (Figura 1).

### **Epidemiología de la enfermedad de Chagas**

El área endémica de la enfermedad de Chagas se extiende desde el sur de Estados Unidos hasta el Sur de Argentina y Chile. De acuerdo a la Organización Mundial de la Salud (OMS), se estima que actualmente existen 10 millones de personas infectadas con *T. cruzi*, con un número de 10 mil muertes al año y más de 25 millones de personas en riesgo de contraer la enfermedad (WHO, 2005/2007; WHO, 2010). En Chile, el área endémica se extiende desde el límite con Perú hasta la VI región, incluyendo la Región Metropolitana. Aunque la OMS declaró como libre de transmisión vectorial a Chile en el año 1999, actualmente se estima que existen aproximadamente 160000 personas infectadas con un número de casos nuevos al año cercano a 1600 (WHO, 2005/2007; MINSAL, 2011).

A pesar de la importante reducción de nuevos casos desde 1990 a la fecha (Tabla 1), gracias a políticas de salud pública para controlar la transmisión vectorial a nivel domiciliario, la migración de personas infectadas con *T. cruzi* desde zonas endémicas representa una amenaza a la salud pública en países no endémicos, como Canadá, USA y países europeos, donde se han reportado casos de transmisión de *T. cruzi* por medio

de productos sanguíneos y trasplantes (WHO, 2005/2007; Schmunis, 2007; Muñoz-Saravia et al., 2012).



Parámetro epidemiológico	1990	2000	2006	2010
Muertes anuales	>45000	21000	12500	10000
Casos de infección	30 millones	18 millones	15 millones	10 millones
Nuevos casos/año	700000	200000	41200	n.d.
Población en riesgo	100 millones	40 millones	28 millones	25 millones

**Tabla 1. Parámetros epidemiológicos de la enfermedad de Chagas: 1990, 2000, 2006, 2010.** Adaptado de WHO 2005/2007; WHO, 2010. n.d. datos no disponibles.

### Aspectos clínicos de la enfermedad de Chagas

La enfermedad de Chagas se divide en 2 fases: aguda y crónica.

a) **Fase aguda:** comienza al cabo de 1-2 semanas, el cual se ha establecido como el periodo de incubación del parásito en el hospedero humano (Rassi et al., 2012; Ribeiro et al., 2012). La duración de la fase aguda es de alrededor de 4-8 semanas y se caracteriza por la presencia de tripomastigotes circulantes, los cuales pueden ser detectados por microscopía óptica en muestras sanguíneas de pacientes infectados. Aunque generalmente es asintomática, puede cursar con fiebre intensa y en algunos casos se describe inflamación e hinchazón en el sitio de la inoculación, signo denominado Chagoma y que se presenta comúnmente en el rostro o extremidades. Cuando el parásito ingresa vía la conjuntiva, se produce hinchazón unilateral en el párpado inferior y superior del paciente, la cual se conoce como signo de Romaña.

El compromiso cardiaco está presente en más del 90% de los casos; sin embargo, el diagnóstico se establece en menos del 10% debido a síntomas moderados. (Yacoub et al., 2008; Punukollu et al., 2007; Rassi et al., 2010; Muñoz-Saravia et al., 2012). Menos del 1% de los pacientes desarrollan la fase aguda severa, con una alta mortalidad asociada a miocarditis, efusión pericárdica y meningoencefalitis (Bern et al., 2011).

b) **Fase crónica:** De los pacientes que desarrollan la fase crónica, el 60-70% no presentan síntomas clínicos evidentes ni tampoco se detecta la presencia de parásitos circulantes. La duración se ha estimado entre 10-30 años luego de la infección. Se caracteriza por la ausencia de evidencia clínico-patológica y generalmente los pacientes presentan un electrocardiograma normal o pequeñas alteraciones en el ritmo cardiaco. Sin embargo, mediante técnicas más sensibles como Holter de ritmo cardiaco o ecocardiografía, se ha descrito que prácticamente la totalidad de los pacientes tienen algún grado de compromiso cardiaco (Punukollu et al., 2007; Rassi et al., 2010; Rossi et al., 2010; Muñoz-Saravia et al., 2012).

El 30-40% de los pacientes crónicos, se vuelven sintomáticos y sufren de alteraciones cardiacas y/o digestivas. De estos, el 90% presenta compromiso cardiaco con síntomas y signos derivados de una falla cardiaca conocida como cardiopatía chagásica crónica (CCC), la cual es usualmente biventricular. El 10% restante desarrolla enfermedad digestiva, principalmente megaesófago y megacolon, y alteraciones en el sistema nervioso periférico (Muñoz-Saravia et al., 2012). La CCC es la manifestación más severa de la enfermedad de Chagas y se asocia con mala prognosis y altas tasas de mortalidad en comparación con cardiopatías de diferente etiología (Vilas et al., 2012; Barbosa et al., 2011; Ribeiro et al., 2012). El diagnóstico se basa en la evaluación clínica y hallazgos en electrocardiograma (ECG) y estudios serológicos (Rassi et al., 2012; Ribeiro et al., 2012).

## **Patogénesis de la Cardiomiopatía Chagásica Crónica**

La cardiomiopatía chagásica es la principal causa de morbilidad y mortalidad de la enfermedad. En la mayoría de los pacientes, la agresión al miocardio permanece controlada a través de mecanismos que aún no son totalmente entendidos y estos pacientes permanecen durante toda su vida en la fase indeterminada sin presentar sintomatología. Por el contrario, los síntomas y signos de la CCC se desarrollan en el 10% a 30% de los infectados. La CCC está compuesta de tres etapas: En la fase inicial el paciente desarrolla algunos síntomas, relacionados con alteraciones del ritmo cardiaco. En la etapa intermedia los signos clínicos se correlacionan con un aumento moderado del tamaño del corazón. La etapa final corresponde a la manifestación clínica más importante y en ella se presenta la falla cardiaca congestiva, arritmias complejas, trombo-embolismo y muerte súbita (Rossi et al., 2010). Las arritmias cardiacas aumentan a medida que la cardiomiopatía se hace más severa, y las alteraciones más frecuentes que presenta el electrocardiograma son bloqueo de la rama derecha, hemibloqueo anterior izquierdo, extrasístoles ventriculares, bradicardia sinusal, fibrilación auricular y bloqueo atrioventricular completo. Estas alteraciones en el ritmo pueden causar palpitaciones, mareos y síncope (Rassi et al., 2010, Rossi et al., 2010, Muñoz-Saravia et al., 2012). La muerte súbita es una complicación ocasional en pacientes con compromiso cardiaco severo que además se asocia a la presencia de una aneurisma apical, una característica de la CCC que sería fuente de eventos tromboemólicicos en cerebro y pulmones (Yacoub et al., 2008; Rassi et al., 2010; Muñoz-Saravia et al., 2012). En aquellos pacientes con cardiomiopatía chagásica establecida, se estima una mortalidad sobre 50% al cabo de 5 años (Yacoub et al., 2008).

Dentro de los mecanismos patogénicos principales que estarían involucrados en el desarrollo de la CCC, se encuentran: i) daño al miocardio dependiente del parásito, ii) daño al miocardio mediado por la respuesta inmune y iii) anormalidades

microvasculares e isquemia (Gutierrez et al, 2009; Rossi et al., 2010, Teixeira et al., 2011).

***i) Daño al miocardio relacionado con la persistencia del parásito.*** Esta teoría nace como consecuencia de la detección de nidos de amastigotes de *T. cruzi* en el tejido cardiaco de un niño que muere de chagas agudo en el año 1911 (Teixeira et al., 2011). Los amastigotes en división producirían la ruptura mecánica de la célula huésped liberando los tripomastigotes además de sustancias pro-inflamatorias, que en conjunto provocarían el daño tisular. Sin embargo, cerca del 90% de los pacientes con CCC no presentan nidos de amastigotes en secciones histológicas del corazón, lo que cuestiona la persistencia parasitaria como mecanismo de desarrollo de la CCC (Teixeira et al., 2011). En favor de la teoría, se ha descrito la presencia de antígenos de *T. cruzi* y su material genómico en focos inflamatorios de tejido cardiaco durante la fase crónica de la enfermedad (Lauria-Pires et al., 2000). Además, en algunos modelos experimentales, los signos y síntomas relacionados con la CCC son atenuados con tratamientos tripanocidas (García et al., 2005). Por otra parte, la reactivación de la enfermedad de Chagas en pacientes inmuno-comprometidos implica la persistencia del parásito en el huésped (Fiorelli et al., 2005). Finalmente, se ha observado agresión directa del parásito en miocitos y apoptosis en etapas avanzadas de la falla cardiaca, pero el rol del parásito en estos procesos sigue siendo controversial (de Souza et al., 2003; Tostes et al., 2005; Pুনukollu et al., 2007; Rossi et al., 2010; Teixeira et al., 2011).

***ii) Mecanismos inmunológicos involucrados en el control del parásito y daño cardiaco.*** Inicialmente, la respuesta inmune predominante es pro-inflamatoria a través de células T de tipo 1 (Th1). En ratones se ha descrito que, durante las fases iniciales de la infección, los macrófagos producen citoquinas que inducen la producción de interferón- $\gamma$  (IFN- $\gamma$ ). El IFN- $\gamma$ , producido por los linfocitos-T CD4+ y CD8+, es esencial para el control de la infección, ya que modula la producción de citoquinas y regula el desarrollo apropiado de la respuesta inflamatoria (Une et al., 2003; Silva et al., 2003).

En los macrófagos activados por IFN- $\gamma$ , el crecimiento intracelular de los parásitos se controla a través de la producción de óxido nítrico (NO). Además, muchas citoquinas, incluyendo IL-10, IL-4 y el factor de crecimiento transformante  $\beta$  (TGF- $\beta$ ), tienen un rol importante en el control de la respuesta inmune contra *T. cruzi* y en la prevención de una inflamación excesiva o descontrolada, la cual podría provocar miocarditis y posteriormente, asociarse con las formas crónicas de la enfermedad (Freire-de-Lima et al., 2000; Freire-de-Lima et al., 2006; Araújo-Jorge et al., 2008; Rocha et al., 2012). El parásito favorece un estado de inmunosupresión mediante la interacción de glicoproteínas presentes en su membrana plasmática con células del sistema inmune (DosReis 2011). Por otro lado, estos mecanismos no sólo estarían relacionados con la evasión de la respuesta inmune, sino que también podrían favorecer el desarrollo de la cardiomiopatía chagásica crónica. Al respecto, se ha descrito que TGF-  $\beta$  tendría un rol importante como agente fibrótico en el tejido cardíaco (Araujo-Jorge et al., 2008; Waghbi et al., 2009). Además, se ha descrito que la cruzipaína, principal cisteína-proteinasa derivada del parásito, es capaz de inducir la secreción TGF-  $\beta$  (DosReis, 2011).

***iii) Anormalidades microvasculares e isquemia.*** Se ha postulado que alteraciones microvasculares isquémicas transitorias, de baja densidad y corta duración, serían la causa de la cardiomiopatía chagásica. Esto explicaría la distribución focal de necrosis celular y la fibrosis intersticial reparadora presente en corazones chagásicos, similar a lo que se observa en modelos experimentales de isquemia y reperfusión (Ramos y Rossi, 1999).

Estudios en ratones infectados, muestran alteraciones microvasculares caracterizadas por microespasmos, microtrombos, disfunción endotelial y actividad plaquetaria aumentada (Rossi et al., 2010; Prado et al., 2011).

Se ha descrito la presencia de agregados plaquetarios que forman trombos oclusivos en vasos pequeños intramiocárdicos y del epicardio, evidencia directa de una alteración microvascular; por otra parte, la liberación de sustancias vasoconstrictoras como el factor activador de plaquetas (PAF) por los macrófagos, causaría isquemia transitoria y necrosis miocárdica (Rossi et al., 2010).

### **Disfunción endotelial en el desarrollo de la cardiomiopatía chagásica crónica**

El endotelio vascular, cumple un número importante de funciones fisiológicas con el objetivo de mantener un flujo sanguíneo óptimo a los órganos, como por ejemplo: prevención de la coagulación, regulación del tono venoso, orquestación de la migración de células del sistema inmune mediante la expresión de moléculas de adhesión, regulación de la vasopermeabilidad y producción de compuestos quimioattractantes (Keller et al., 2003). El daño o la activación de células endoteliales en respuesta a inflamación pueden provocar una alteración en estas funciones, lo que puede generar que la superficie del endotelio cambie desde un estado anti-trombótico hacia uno pro-trombótico, lo que comúnmente se conoce como activación o disfunción endotelial (Wu y Thiagarajan, 1996). Por otra parte, la adhesión de los leucocitos circulantes al endotelio vascular es el paso fundamental para su extravasación durante la inflamación. Este proceso está mediado por moléculas de adhesión como E-selectina, la molécula de adhesión intercelular-1 (ICAM-1), la molécula de cito-adhesión vascular-1 (VCAM-1) además de integrinas y otras moléculas expresadas sobre los leucocitos (Macías et al., 2003). Durante una infección aguda, el endotelio puede activarse directamente por el patógeno, o indirectamente por medio de la liberación de mediadores inflamatorios, alterando el sistema de la coagulación y fibrinólisis (Peters et al., 2003; Keller et al., 2003). La activación de células endoteliales con agonistas de receptores de tipo Toll (Lipopolisacárido, LPS) provoca un aumento en la expresión de E-selectina, P-selectina, ICAM-1 y VCAM-1, además de citoquinas pro-inflamatorias (IFN- $\gamma$ , IFN- $\alpha$ , IL-6) y quimioquinas (CCL2, CCL3, CCL5) (Seeley et al., 2012).

En la enfermedad de Chagas, el estado protrombótico descrito para pacientes crónicos estaría relacionado con el desarrollo de disfunción endotelial. Al respecto, algunos autores han descrito un aumento en los niveles de marcadores endoteliales de inflamación en pacientes asintomáticos crónicos, sugiriendo que una exposición prolongada a estos marcadores podría afectar la progresión de la CCC (Herrera et al., 2011). Aunque el rol de la disfunción endotelial en la enfermedad de Chagas no ha sido bien establecido, se ha reportado una correlación entre la disfunción endotelial y niveles plasmáticos de diferentes citoquinas y moléculas de adhesión del endotelio para otras patologías cardiacas (Herrera et al., 2011). Por otro lado, existe una relación directa entre las plaquetas y el endotelio inflamado cuando éste es activado (Factor et al., 1985; Rossi y Ramos, 1996; Tanowitz et al., 1990; Danese et al., 2007). En células endoteliales infectadas con la cepa Tulahuen de *T. cruzi*, aumentó la agregación plaquetaria, factor que podría favorecer los procesos de trombosis (Rossi et al., 2010). Cabe señalar que los tripomastigotes producen neuroaminidasa, una enzima que remueve el ácido siálico de la superficie de las células mamíferas del miocardio y endotelio. Ello favorecería la agregación plaquetaria en la superficie endotelial y la trombosis microvascular durante la etapa crónica (Libby et al., 1986). Se ha sugerido que miembros de la familia transialidasa pueden jugar un rol en la respuesta endotelial a la infección por *T. cruzi*. Miembros inactivos de esta familia gatillan la activación del factor de necrosis NF- $\kappa$ B, expresión de moléculas de adhesión (E-selectina, VCAM-1, ICAM-1) y aumentan la susceptibilidad celular del endotelio a la infección (Dias et al., 2008; Rossi et al., 2010). Recientemente, se han descrito cambios en la expresión de genes asociados con disfunción endotelial, fibrosis y miocarditis en corazones infectados con *T. cruzi*. Los autores describen un aumento de al menos cinco veces en la expresión de moléculas de adhesión como P-selectina, Integrina  $\beta$ 3 e ICAM-1, en endotelio y tejido cardiaco. Esto concuerda con los niveles de expresión aumentados

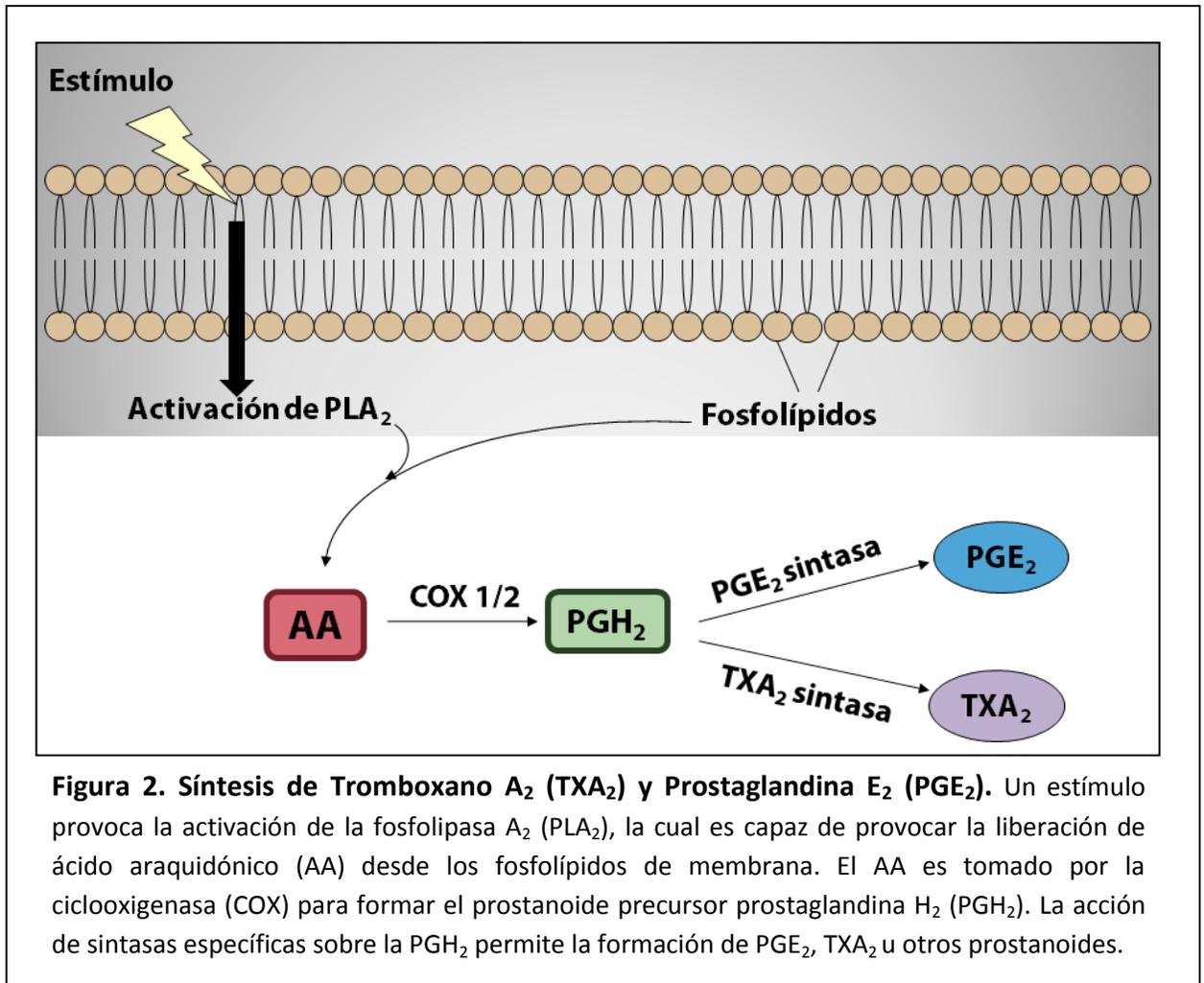
de TNF- $\alpha$ , citoquina que favorece la adhesión de leucocitos al endotelio y además aumenta la expresión de ICAM-1 (Soares et al., 2010).

### **Rol de los prostanoides en el desarrollo de la disfunción endotelial y CCC: Tromboxano A<sub>2</sub> (TXA<sub>2</sub>) y prostaglandinas**

Los prostanoides forman parte de una gran familia de mediadores lipídicos denominados eicosanoides. Los eicosanoides son metabolitos derivados del ácido araquidónico (AA), y las sub-clases de eicosanoides son generadas por distintos pasos metabólicos. El AA es hidrolizado por las enzimas ciclooxigenasas (COX) dando origen a la prostaglandina H<sub>2</sub> (PGH<sub>2</sub>). La PGH<sub>2</sub> luego es metabolizada por sintasas terminales específicas para generar prostanoides, como las prostaglandinas y tromboxanos (Alfranca et al., 2006; Machado et al., 2011) (Figura 2). Se ha descrito que los prostanoides, poseen un rol clave en el desarrollo de la disfunción endotelial, mediante la activación de sus receptores presentes en células del endotelio.

El TXA<sub>2</sub>, es un prostanoides con reconocida actividad pro-inflamatoria, ya que es capaz de activar y aumentar la producción de citoquinas por los monocitos, aumentar la permeabilidad vascular y la expresión de moléculas de adhesión (VCAM-1, ICAM-1) (Caughey et al., 1997; Patrono et al., 2005; Nakahata, 2008). Además, es capaz de promover la activación de las plaquetas, lo que se traduce en su cambio de forma, agregación y degranulación, promoviendo la formación de trombos y trombosis (Nakahata, 2008). En sepsis, la agregación plaquetaria podría tener un rol protector, al favorecer el reclutamiento de células del sistema inmune como los neutrófilos; sin embargo, la acumulación excesiva de neutrófilos gatillada por la activación plaquetaria y liberación de TXA<sub>2</sub> se ha asociado con daño tisular en modelos *in vivo* de sepsis (Seeley et al., 2012). El TXA<sub>2</sub>, al ser un potente vasoconstrictor, produce estrechamiento de arterias coronarias y resistencia de los vasos. La formación de

trombos mediada por la agregación plaquetaria y vasoconstricción inducidas por  $\text{TXA}_2$  se asocia con infarto al miocardio (Belhassen et al., 2003; Nakahata, 2008).



**Figura 2. Síntesis de Tromboxano A<sub>2</sub> (TXA<sub>2</sub>) y Prostaglandina E<sub>2</sub> (PGE<sub>2</sub>).** Un estímulo provoca la activación de la fosfolipasa A<sub>2</sub> (PLA<sub>2</sub>), la cual es capaz de provocar la liberación de ácido araquidónico (AA) desde los fosfolípidos de membrana. El AA es tomado por la ciclooxigenasa (COX) para formar el prostanoide precursor prostaglandina H<sub>2</sub> (PGH<sub>2</sub>). La acción de sintasas específicas sobre la PGH<sub>2</sub> permite la formación de PGE<sub>2</sub>, TXA<sub>2</sub> u otros prostanoideos.

Las alteraciones microvasculares presentes en la enfermedad de Chagas, podrían estar relacionadas con los efectos del TXA<sub>2</sub>, ya que se ha descrito un aumento de los niveles plasmáticos de este prostanoide y aumento de la adherencia y agregación plaquetaria, en modelos murinos de infección con *T. cruzi* (Tanowitz et al., 1990; Cardoni y Antúnez 2004; Ashton et al., 2007; Rossi et al., 2010). Por otro lado, el parásito en todas sus formas es capaz de sintetizar TXA<sub>2</sub>. En células endoteliales infectadas con *T. cruzi* los amastigotes producen TXA<sub>2</sub>, controlando la proliferación y la respuesta inflamatoria resultante de la infección (Ashton et al., 2007; Tanowitz et al., 2011).

Por lo tanto, el TXA<sub>2</sub> favorecería la agregación plaquetaria intravascular, espasmos microvasculares y procesos isquémicos descritos en pacientes y modelos animales infectados con *T. cruzi* (Rossi et al., 2010; Rassi et al., 2010; Machado et al., 2011; Prado et al., 2011).

Existen numerosos estudios que describen aumento de los niveles de distintas prostaglandinas, como PGE<sub>2</sub>, PGI<sub>2</sub>, y PGF<sub>2α</sub>; sin embargo no se ha establecido un rol específico para el aumento de PGI<sub>2</sub> y PGF<sub>2α</sub> (Pinge-Filho et al., 1999; Cardoni et al., 2004; Ashton et al., 2007). La mayoría de los resultados indicarían que el principal rol de estos eicosanoides sería manipular la respuesta inflamatoria del hospedero y así se favorecería la transición hacia el estado crónico. La PGE<sub>2</sub> favorecería un estado de inmunosupresión durante la fase aguda de la infección por *T. cruzi* al disminuir la producción de interleukina-2 (IL-2), citoquina necesaria para el crecimiento u activación de linfocitos T (Michelin et al., 2005). Además, se ha sugerido la participación de la PGE<sub>2</sub> en el desarrollo de fibrosis cardíaca, ya que ratones infectados tratados con inhibidores de la síntesis de prostaglandinas, presentan menor fibrosis y menores niveles de TGF-β (Abdalla et al., 2008). La síntesis de PGE<sub>2</sub> durante la infección por *T. cruzi* se relaciona con la producción de NO. El TNF-α liberado por macrófagos infectados con *T. cruzi* favoreció la producción de cuerpos apoptóticos de linfocitos T o neutrófilos. La fagocitosis de estos cuerpos apoptóticos indujo la producción de TGF-β y

PGE<sub>2</sub>, disminuyendo el contenido de NO en el macrófago; permitiendo que el parásito prolifere (Freire De Lima et al., 2000; Lopes et al., 2000). Este evento estaría relacionado además con la formación de cuerpos lipídicos por la célula hospedera luego de la infección con *T. cruzi* (D'Avila et al., 2011). Por otro lado, se ha visto que macrófagos y células del bazo de ratones infectados con *T. cruzi* contienen niveles altos de PGE<sub>2</sub> (Monamaris et al., 1998; Pinge-Filho et al., 1999).

**Tratamiento de la enfermedad de Chagas:** Los fármacos actualmente usados para el tratamiento de la enfermedad de Chagas son nifurtimox y benznidazol. Ambos son tripanocidas contra todas las formas del parásito (Maya et al., 1997; Maya et al., 2007). Benznidazol y nifurtimox, son compuestos nitroheterocíclicos que contienen un grupo nitro unido a un anillo imidazol y furano, respectivamente (Figura 3). Ambos compuestos serían capaces de reducirse en presencia de nitrorreductasas con la consecuente formación de radicales libres y/o metabolitos electrofílicos. Sin embargo, en el parásito sólo estarían presentes nitrorreductasas independientes de oxígeno conocidas como nitrorreductasas de tipo-I, las cuales sólo catalizarían la formación de metabolitos reactivos de derivados de hidroxilamina, por lo que su mecanismo de acción tripanocida estaría relacionado sólo con este efecto (Mejia et al., 2012).

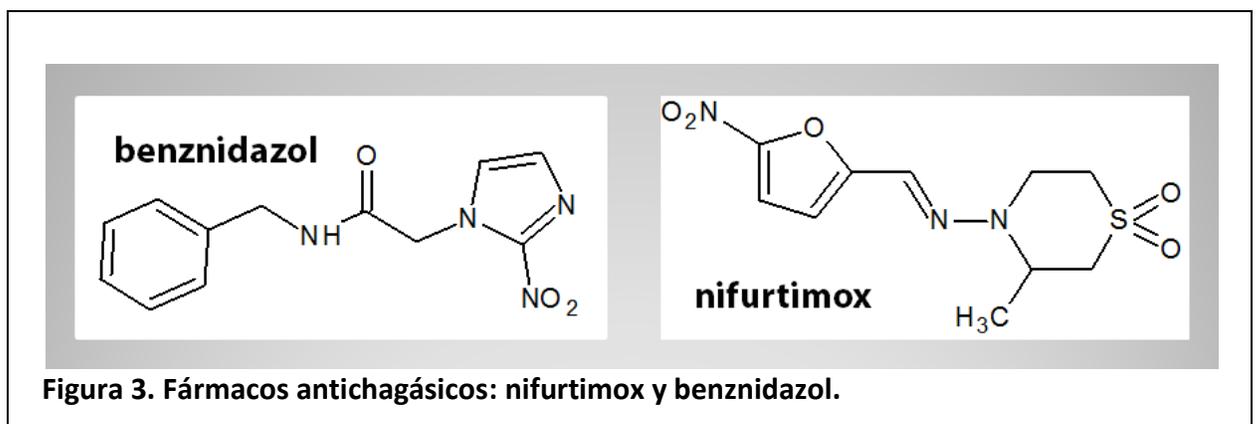


Figura 3. Fármacos antichagásicos: nifurtimox y benznidazol.

El tratamiento con nifurtimox y benznidazol se asocia con toxicidad sistémica y efectos adversos que representan la principal amenaza para su uso clínico, que con frecuencia obliga a suspender la terapia (Castro et al., 2006; Viotti et al., 2009; Bartel et al., 2010; Jackson et al., 2010; Pinazo et al., 2010; Urbina et al., 2010). Así, los efectos adversos más comunes de nifurtimox incluyen anorexia, vómitos, polineuropatía periférica, pérdida de peso y dermatopatía alérgica. El uso de benznidazol se asocia con alergia generalizada, dermatopatía, fiebre, adenopatía, neuropatía periférica, leucopenia y agranulocitosis (Matta et al., 2012). Durante la etapa aguda, el tratamiento con estos fármacos antichagásicos puede producir cura parasitológica en un 60-85% de los casos (Bern et al., 2011; Rassi et al., 2012).

### **Terapia antichagásica en la cardiomiopatía chagásica crónica**

Como se mencionó anteriormente, el tratamiento con benznidazol y nifurtimox es generalmente efectivo en la fase aguda de la infección; sin embargo, la evidencia respecto de la eficacia del tratamiento en la etapa crónica es controversial. Por otro lado, estudios en pacientes chagásicos crónicos, han demostrado que el tratamiento con nifurtimox es poco tolerado. Esto se traduce en una baja adherencia al tratamiento en comparación con benznidazol que ha demostrado ser más seguro en su uso en pacientes chagásicos crónicos (Hasslocher-Moreno et al., 2012; Jackson et al., 2010).

Estudios en animales, han mostrado que benznidazol 100 mg/kg administrado 45 días después de la infección con *T. cruzi* y durante 8 meses, es capaz de disminuir la miocarditis. Además, los autores describen que este esquema de tratamiento disminuyó la ocurrencia de alteraciones en la conducción cardíaca. Sin embargo, el tratamiento empleado fue incapaz de erradicar completamente el parásito (García et al., 2005). En un estudio posterior realizado por Caldas (2008), los animales tratados con benznidazol 100 mg/Kg durante la fase aguda, presentaron una carga parasitaria menor en comparación con los animales no tratados, pero no se evidenciaron cambios

significativos sobre las lesiones cardiacas ni tampoco cura parasitológica (Caldas et al., 2008). Estos resultados serían diferentes a lo observado por Bustamante et al. (2007), donde se mostró que al administrar benznidazol 100 mg/kg durante 20 días en la etapa aguda o crónica, es posible obtener una respuesta protectora CD8<sup>+</sup>T y cura parasitológica. Es importante resaltar que los estudios mencionados utilizaron distintas cepas de *T. cruzi* y de ratones, por lo que la diferencia de resultados puede ser atribuida tanto a características propias del parásito como del sistema inmune de los animales utilizados.

Estudios recientes muestran que benznidazol modula la liberación de citoquinas pro-inflamatorias y de NO mediante la inhibición de NF-κB (Manarin et al., 2010; Piaggio et al., 2001). En otros modelos celulares, se ha reportado que NF-κB es capaz de inducir la expresión de ICAM-1 (Melotti et al., 2001; Xue et al., 2009). Esta evidencia sugiere que benznidazol podría disminuir indirectamente la expresión de moléculas de adhesión, mediante la inhibición de NF-κB otorgando protección al endotelio.

En pacientes en la fase post-aguda y sin daño cardiaco el uso de benznidazol se asocia con una disminución en la progresión de la enfermedad de Chagas y un aumento en la sero-conversión negativa (Viotti et al., 2006). Respecto de la eficacia del tratamiento sobre la cardiopatía chagásica crónica, se espera que a fines del año 2013, el estudio clínico en desarrollo denominado "BENEFIT" (Benznidazole Evaluation for Interrupting Trypanosomiasis), pueda entregar información importante sobre la utilidad clínica de benznidazol en este tipo de pacientes.

Actualmente, no existen fármacos clínicamente más efectivos que nifurtimox o benznidazol, por lo que un enfoque alternativo para el tratamiento de la enfermedad de Chagas, es aumentar la actividad de los fármacos antichagásicos usados en la actualidad, o modificar la respuesta inmune del hospedero, haciendo más eficientes estas terapias.

Debido a que los prostanoideos tendrían un rol importante en el desarrollo de la CCC, la utilización de antiinflamatorios no esteroideos (AINEs) para inhibir las COX ha sido evaluada en diversos modelos murinos con diversos resultados (Freire de Lima et al., 2000; Hideko et al., 2008; Michelin et al., 2005; Mukherjee et al., 2011). La utilización de aspirina (AAS), indometacina, o el inhibidor selectivo COX2 celecoxib, aumentaron la mortalidad y parasitemia en ratones infectados (Hideko et al., 2008; Mukherjee et al., 2011). Sin embargo, otros autores han descrito resultados opuestos, donde se evidencia un aumento de supervivencia y disminución de parasitemia, en ratones chagásicos y tratados con inhibidores de las COX (Abdalla et al., 2008; Freire de Lima et al., 2000; Michelin et al., 2005; Paiva et al., 2007). Cabe señalar, que datos de nuestro laboratorio han mostrado que la aspirina reduce la infección intracelular en células RAW 264.7. Más aún, hubo una clara sinergia entre la aspirina, nifurtimox y benznidazol, lo que fue demostrado a través de análisis isoblográfico (López et al., 2010). Además, bajas dosis de aspirina redujeron significativamente la parasitemia, la miocarditis y la mortalidad en ratones BALB/c infectados con *T. cruzi* en un modelo agudo. Sin embargo, se desconoce el beneficio a largo plazo de la inhibición de prostaglandinas en pacientes chagásicos.

De acuerdo a estos antecedentes, en esta tesis se propone el estudio del efecto de aspirina, benznidazol y su combinación, sobre el desarrollo de la cardiopatía crónica, en un modelo murino de la enfermedad de Chagas.

## **HIPOTESIS**

***La aspirina previene el desarrollo del daño microvascular provocado en la enfermedad de Chagas crónica y además, aumenta el efecto antichagásico de benznidazol a través de la inhibición de la síntesis de prostaglandina E<sub>2</sub> y tromboxano A<sub>2</sub>.***

## **OBJETIVO GENERAL:**

Estudiar el efecto del tratamiento combinado de aspirina y benznidazol sobre la infección crónica por *Trypanosoma cruzi*, en un modelo murino.

## **OBJETIVOS ESPECÍFICOS:**

- 1.** Establecer el modelo de infección crónica de Chagas para la cepa Dm28c, en ratones BALB/c y C57BL/6.
- 2.** Estudiar *in vivo* el daño microvascular generado por la cepa Dm28c de *T. cruzi*, para lo cual se evaluó:
  - a) la morfología de la arquitectura vascular y del miocardio.
  - b) la expresión de ICAM-1 en tejido cardiaco
  - c) los niveles séricos de TXA<sub>2</sub>, sICAM-1 y sE-selectina
- 3.** Determinar el efecto de la aspirina en la inhibición de la síntesis de prostaglandinas y tromboxanos, en ratones chagásicos crónicos. Para ello se evaluó:
  - a) la morfología de la arquitectura vascular y del miocardio.

- b) la expresión de ICAM-1 en tejido cardiaco
  - c) los niveles séricos de TXA<sub>2</sub>, sICAM-1 y sE-selectina
- 4.** Comparar la eficacia del tratamiento con aspirina, benznidazol y ambos en combinación, en ratones infectados crónicamente con la cepa Dm28c de *T. cruzi*. Para ello se evaluó:
- a) la parasitemia por análisis microscópico y PCR en tiempo real.
  - b) la persistencia parasitaria en el tejido cardiaco por medio de técnicas histológicas.
  - c) el tiempo de supervivencia de los ratones.

## II. MATERIALES Y MÉTODOS

### 1. Animales.

Se utilizaron ratones machos adultos de 4-6 semanas de edad y 20-25 g de peso de las cepas BALB/c y C57BL/6. Los animales fueron obtenidos del Bioterio Central de la Facultad de Medicina de la Universidad de Chile y fueron mantenidos en jaulas estándar (27,5 x 17 x 12,5 cm) en un número no mayor a 5 ratones por grupo y en condiciones controladas de temperatura y ciclos de 12 horas de luz y oscuridad. Los ratones recibieron alimento y agua *ad libitum*. Los animales agresivos fueron separados del grupo y mantenidos de forma individual. Los animales fueron eutanasiados mediante la administración de ketamina 150 mg/kg (Drug pharma Invetec, Chile) y xilazina 30 mg/Kg (Laboratorios Alfasan, Argentina) en los días indicados para cada experimento.

Todos los protocolos de manejo de animales fueron aprobados por el Comité de Bioética de la Facultad de Medicina de la Universidad de Chile Protocolo CBA N°0277 (proyecto FONDECYT 1090078).

### 2. Modelo de Infección crónica.

Para los estudios de estandarización del modelo de infección, los ratones en estudio fueron infectados por vía intraperitoneal con 250, 500, 1.000 o 10.000 tripomastigotes sanguíneos de la cepa Dm28c de *T. cruzi* obtenidos de ratones infectados. Para los estudios farmacológicos, los animales fueron inoculados con 500 tripomastigotes y posteriormente, se dividieron aleatoriamente en grupos experimentales de 7 animales para la administración de los distintos tratamientos.

La infección con *T. cruzi* fue confirmada mediante visualización directa por microscopía de tripomastigotes sanguíneos en muestras de sangre periférica obtenidas entre los días 4 y 7 post-infección (Huang et al., 2002; Bustamante et al., 2007). Para confirmar la

enfermedad cardíaca aguda y crónica, se realizaron estudios histopatológicos de tejido cardíaco obtenido de animales eutanasiados en los días 10, 24 y 90 post-infección (Basombrío y Besuschio, 1982; Huang et al., 2002; Bustamante et al., 2007).

### **3. Tratamientos Farmacológicos de los animales**

Los ratones fueron tratados con aspirina y/o benznidazol durante 20 días a partir del día 2 post-infección (tratamiento temprano) o a partir del día 20 post-infección (tratamiento tardío). Las dosis diarias de aspirina utilizadas para evaluar el efecto de la inhibición de la síntesis de tromboxano y prostaglandinas fueron 2 y 40 mg/Kg/día, respectivamente. Estas dosis son equivalentes a la administración aproximada de 100 mg/día y 2 g/día de AAS para un individuo de 60 Kg (Cyrus et al., 2002; Bulckaen et al., 2008; Hideko et al., 2008). Las dosis diarias de benznidazol utilizadas fueron de 30 mg/Kg y 100 mg/Kg. Los fármacos fueron preparados en una suspensión de carboximetilcelulosa (CMC) 0,5% y administrados en una dosis única diaria por vía oral mediante sonda en un volumen de 100 µL. Para los tratamientos en combinación, la aspirina se administró 15-20 minutos después de la administración de benznidazol. Los controles no tratados recibieron 100 µL de CMC 0,5% en ausencia de los fármacos.

### **4. Parasitemias y sobrevida**

La parasitemia se evaluó por visualización directa de las formas tripomastigotas en sangre periférica obtenida de la cola de los animales (Huang et al., 2002; Bustamante et al., 2007). Para los análisis de sobrevida, los ratones controles sanos, infectados y tratados fueron mantenidos durante 90 días y su supervivencia se graficó de acuerdo al método de Kaplan-Meier.

## 5. Técnicas Histológicas

**Preparación de las muestras de tejido cardíaco.** Los corazones previamente seccionados longitudinalmente en mitades, fueron fijados en formalina tamponada (formaldehído 4%/ buffer fosfato 0.1 M; pH 7,3) durante 18 h. Luego, el tejido cardíaco se deshidrató en una batería de etanol (50 %, 60%, 70%, 80%, 90%, 96% y 100 %), clarificados en xilol, embebidos en parafina, y seccionados en cortes de 5 µm de espesor.

**Evaluación de inflamación cardíaca y presencia de amastigotes.** Luego de su desparafinación, los cortes fueron sometidos a una tinción con hematoxilina-eosina para evaluar microscópicamente la presencia de amastigotes y núcleos de infiltrado inflamatorio en el miocardio. Las secciones fueron examinadas en microscopio óptico (Leitz Orthoplan) y las imágenes fueron captadas con una cámara Canon PC1256.

**Evaluación de la expresión de moléculas de adhesión.** Los cortes, una vez desparafinados, se suspendieron en buffer citrato 0,01 mol/L, pH 6 y se colocaron en una vaporera convencional durante 60 minutos. Luego de bloquear la unión inespecífica y eliminar la actividad peroxidásica endógena, los cortes fueron incubados con los anticuerpos primarios durante 12 horas a 4°C en una dilución 1:1000 (VCAM-1, rata anti-ratón; ICAM-1, rata anti-ratón; Santa Cruz Biotechnology). Luego de lavar las muestras, éstas se incubaron con el anticuerpo secundario biotinilado (conejo anti-rata, Vector Laboratories) en una dilución 1:50, durante 60 minutos. La tinción se realizó mediante la utilización de un kit comercial del complejo estreptavidina-peroxidasa de rábano picante (*horseradish peroxidase*, HRP) utilizando como cromógeno diaminobenzidina de acuerdo a las instrucciones del fabricante (RTU-Vectastain Kit, Vector Laboratories). Los cortes de tejido cardíaco luego fueron sometidos a una contra-tinción con hematoxilina de Mayer (Dako, Dinamarca) y luego se utilizó como medio de montaje Entellan (Merck-Millipore, Alemania). Todos los experimentos se

realizaron en muestras de corazones de ratones sanos, infectados y tratados, utilizando como control negativo, duplicados de las muestras reemplazando el anticuerpo primario por PBS. Todos los controles fueron negativos. Las secciones fueron examinadas en microscopio óptico (Leitz Orthoplan) y las imágenes fueron captadas con una cámara Canon PC1256.

#### **6. Niveles plasmáticos de marcadores de disfunción endotelial.**

Los niveles plasmáticos de TXB2 (metabolito estable de TXA2), sICAM-1 y sE-selectina, fueron determinados en muestras plasmáticas de ratones supervivientes mediante kits de inmunoensayos (ELISA) de acuerdo a las indicaciones del fabricante (R&D Systems, Cayman Chemical). Las muestras fueron obtenidas en los días 24 y 90 post-infección.

#### **7. Determinación del tiempo de sangrado.**

El tiempo de sangrado fue determinado en el día 10 post infección de acuerdo a Fabre et. al (1999). Se realizó un corte en la punta de la cola y se aplicó cada 15 segundos una tira de papel filtro durante 5 segundos hasta que la sangre dejara de fluir.

#### **8. Determinación de material genético de *T. cruzi* en sangre y tejidos mediante PCR convencional.**

**Extracción de DNA:** La extracción de material genético de muestras de sangre total y tejido cardiaco se realizó mediante el Kit de purificación de DNA genómico Wizard® (Promega Co.). Los corazones fueron homogeneizados en 1 ml de KCl 1,18 %. Las muestras de sangre fueron obtenidas mediante punción cardiaca en presencia de EDTA como anticoagulante. El DNA extraído se cuantificó por espectroscopía a 260 nm y su pureza fue determinada por la relación de absorbancia entre 260 y 280 nm.

Posteriormente las muestras de DNA fueron ajustadas a una concentración stock de 10 ng/mL y almacenadas a -20°C hasta su utilización.

**PCR:** Para el proceso de amplificación se utilizó una cantidad de 50 ng de DNA genómico, de acuerdo a Cummings *et al.*, 2003. La mezcla de reacción contenía DNA Taq polimerasa recombinante 2,5 U (Invitrogen®); dNTP 100 mM (Promega®); 10X PCR Buffer (Invitrogen®); MgCl 5mM (Invitrogen®); BSA 1%; y los partidores S35 (5'-AAATAATGTACGGGKGAGATGCATGA-3') y S36 (5'-GGGTTTCGATTGGGGTTGGTGT-3') 200 nM, los cuales amplifican una secuencia de 330 pb de DNA de minicírculos de *T. cruzi*. El ciclo termal consistió en una etapa de activación de la polimerasa a 98°C por 1 min seguido de la fase de alineamiento a 64°C por 2 min (1 ciclo), una fase de amplificación desarrollada en 2 pasos: 94°C por 1 min y 64°C por 1min (30 ciclos) y la fase final de elongación a 72°C por 10 min. Los productos amplificados luego de la reacción de PCR convencional fueron identificados por medio de electroforesis en gel de agarosa 1%-2%.

## **9. Análisis estadístico.**

Los resultados representan la media de al menos 3 experimentos independientes  $\pm$  SD. Ellos fueron analizados mediante análisis de varianza (ANOVA) de una vía y dos vías según corresponda. Para los análisis de sobrevida la significancia estadística se evaluó de acuerdo al test Log Rank o Mantle-Cox.

### III. RESULTADOS

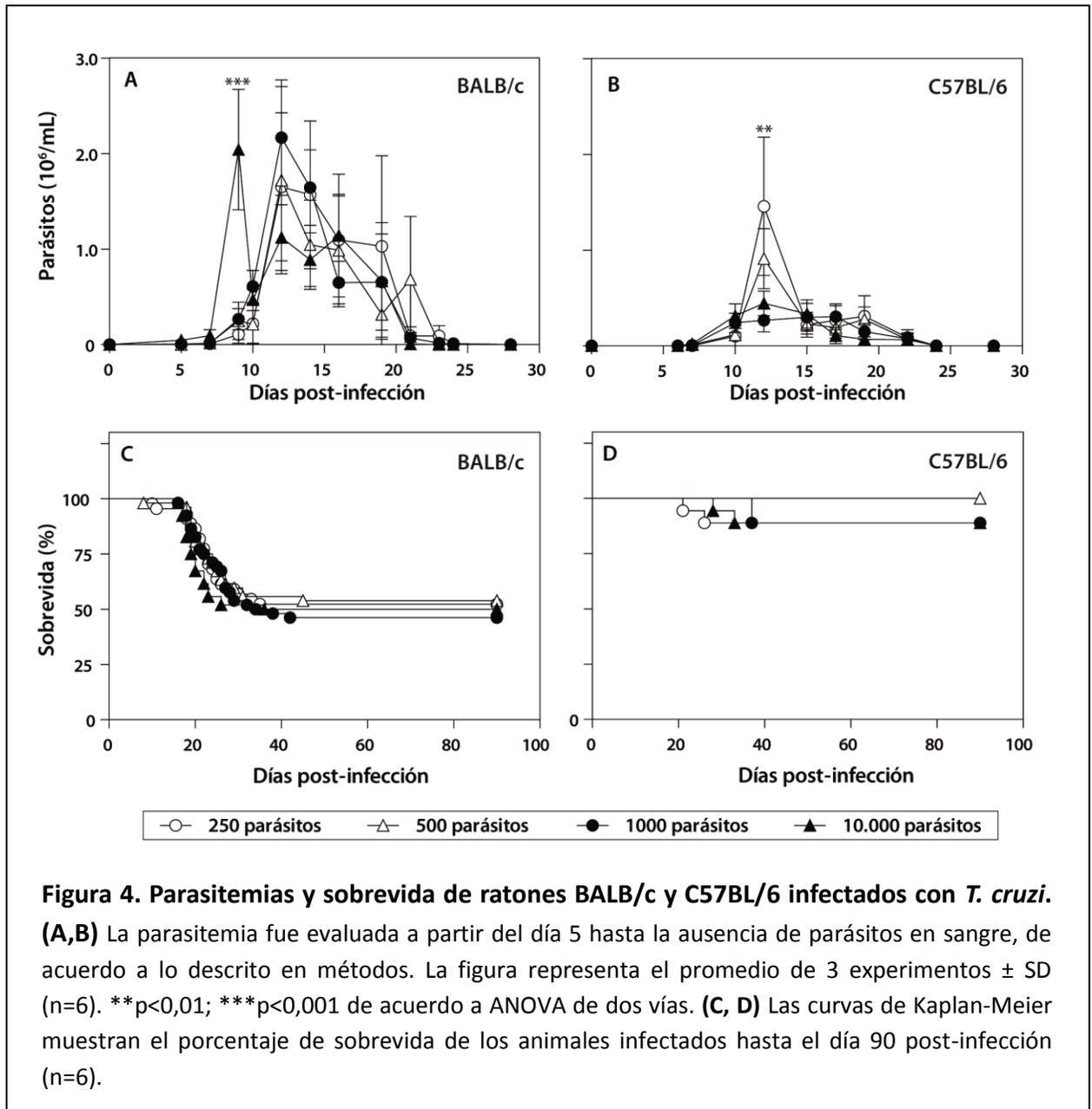
#### Establecimiento del modelo de Infección Crónica

La estandarización del modelo de infección crónica se realizó evaluando la influencia del número de parásitos inoculados sobre:

- a) **Niveles de parasitemia**
- b) **Sobrevida**
- c) **Presencia de material genético en tejido y sangre de los ratones infectados**
- d) **Alteraciones histopatológicas en tejido cardiaco.**

Además se utilizaron dos cepas de ratones, una sensible y otra resistente a la infección (BALB/c y C57BL/6 respectivamente). El objetivo de estos experimentos, es establecer un número de parásitos óptimo para realizar la infección.

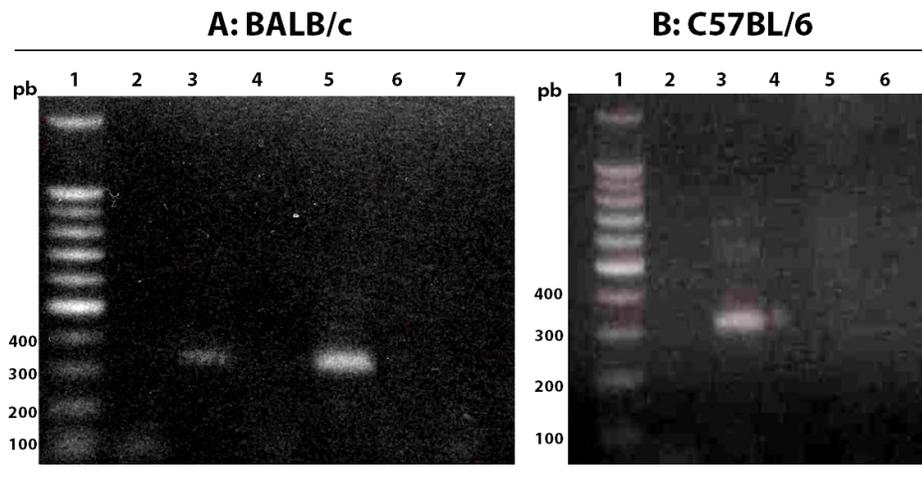
**a) Parasitemia:** Para establecer la duración de la etapa aguda de la infección (tripomastigotes circulantes en sangre), se evaluó la parasitemia. Ambas cepas de ratones presentan parasitemias positivas entre los días 5-25 post-infección, independientemente del tamaño del inóculo empleado para la infección. Luego del día 25 post-infección, la parasitemia se hizo indetectable por microscopía óptica (Figura 4). Los niveles de parasitemia alcanzados no mostraron diferencias entre los distintos inóculos, a excepción del grupo infectado con 10.000 tripomastigotes, que presentó un peak de parasitemia significativamente superior al resto de los inóculos en el día 9 post-infección (Figura 4A,  $p < 0,001$ ). Cabe señalar además, que las parasitemias alcanzadas por los ratones BALB/c, cepa sensible a la infección por *T. cruzi*, fueron significativamente mayores que aquellas de la cepa C57BL/6, cepa resistente (Figura 4A y 4B, respectivamente).



**b) Sobrevida:** Para establecer si el número de parásitos empleado en la infección afectaba el tiempo de sobrevida de los animales, los ratones fueron mantenidos durante 90 días luego de la infección. La evaluación de la sobrevida de los animales se obtuvo mediante la construcción de curvas de Kaplan-Meier. Similar a lo reportado por

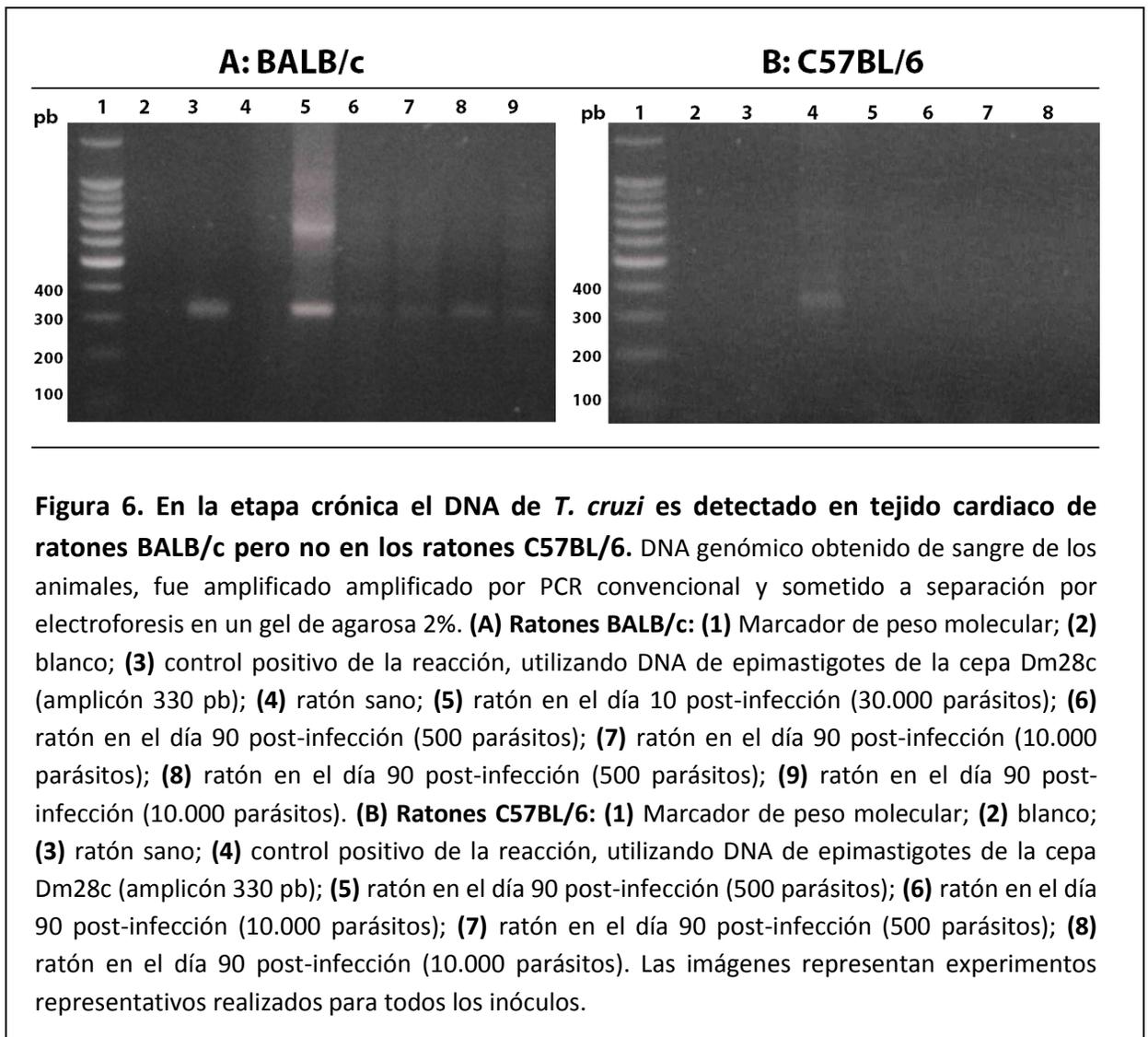
otros autores (Cardoni et al., 2004), el 50% de los ratones BALB/c murió entre los días 15-30 post-infección. Sin embargo, la sobrevivencia no se vio afectada por el número de parásitos empleados para la infección, ya que no hubo diferencias significativas entre los grupos infectados,  $p > 0,05$  (Figura 4C). Por otro lado, los ratones C57BL/6 no presentaron diferencias significativas en la sobrevivencia respecto del grupo control sano, lo que refleja su resistencia a la infección,  $p > 0,05$  (Figura 4D).

**c) Presencia de DNA de *T. cruzi* en sangre y tejido cardíaco en la etapa crónica de la infección:** La fase crónica se caracteriza por la ausencia de parásitos circulantes en la sangre. Por lo tanto, como una manera de evaluar el curso de la infección en nuestro modelo, se analizó la presencia de DNA de *T. cruzi* en sangre obtenida de ratones en la etapa crónica mediante PCR convencional (90 días post-infección). La figura 5 muestra la evaluación de la presencia de DNA parasitario en muestras de sangre de ratones BALB/c, utilizando como control positivo, una muestra obtenida de animales infectados con 30.000 parásitos, modelo de infección aguda empleada en nuestro laboratorio (Faúndez et al., 2008). Sólo en la muestra del modelo agudo se observó DNA de *T. cruzi* (Figura 2, carril 5). Esto indica que independiente del número de parásitos empleados en nuestro modelo, a los 90 días post-infección no se observa presencia de material genético parasitario circulante.



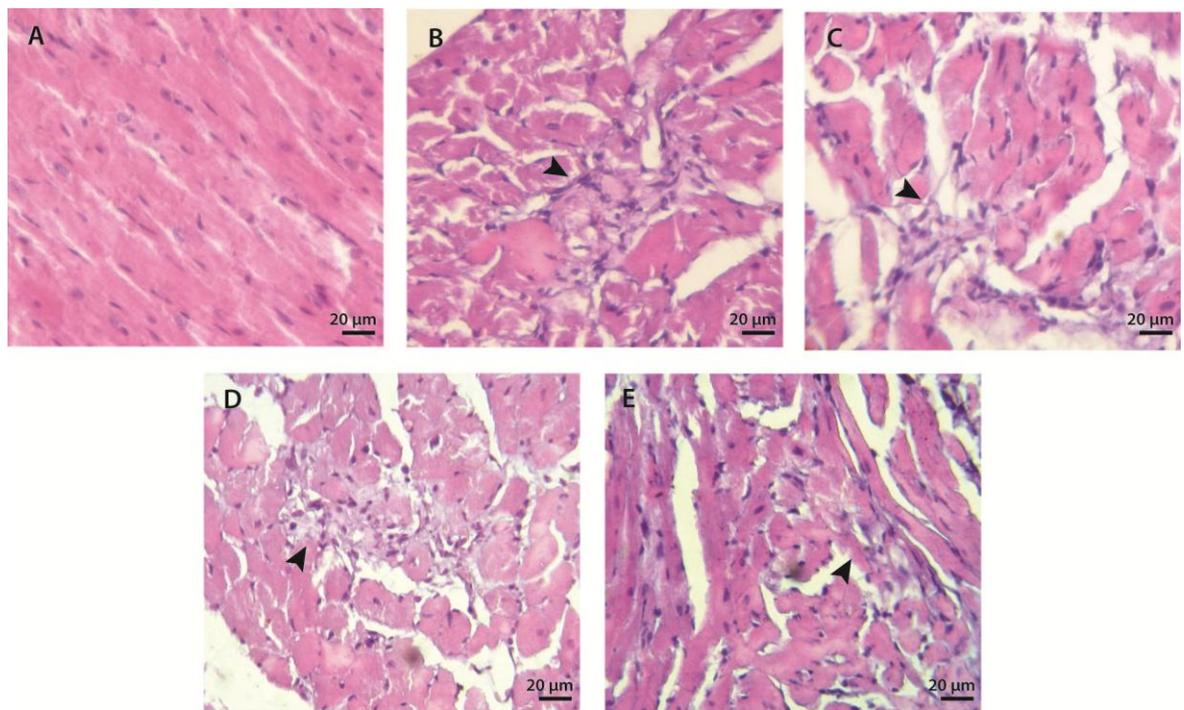
**Figura 5. En la etapa crónica no se detecta DNA de *T. cruzi* en sangre de ratones BALB/c y C57BL/6.** DNA genómico obtenido de sangre de los animales, fue amplificado por PCR convencional y sometido a separación por electroforesis en un gel de agarosa 1%. **(A) Ratones BALB/c:** (1) Marcador de peso molecular; (2) blanco, (3) control positivo de la reacción utilizando DNA de epimastigotes cepa Dm28c (amplicón 330 pb); (4) ratón sano; (5) ratón en el día 10 post-infección (30.000 parásitos); (6) ratón en el día 90 post-infección (250 parásitos); (7) ratón en el día 90 post-infección (10.000 parásitos). **(B) Ratones C57BL/6:** (1) Marcador de peso molecular; (2) blanco, (3) control positivo de la reacción utilizando DNA de epimastigotes cepa Dm28c (amplicón 330 pb); (4) ratón sano; (5) ratón en el día 90 post-infección (250 parásitos); (6) ratón en el día 90 post-infección (10.000 parásitos). Las imágenes representan experimentos representativos realizados para todos los inóculos.

Si bien en la etapa crónica no se observa DNA parasitario en sangre, se ha descrito la presencia de material genético parasitario en el tejido cardiaco en modelos murinos crónicos (Barrera et al., 2008). La figura 6 muestra la detección de DNA parasitario en tejido cardiaco de ratones BALB/c y C57BL/6 en la etapa crónica (90 días post-infección) mediante PCR convencional. Se puede observar que todas las muestras de tejido cardiaco de los ratones BALB/c, independientemente de la cantidad de parásitos inoculados, presentaron bandas correspondientes al amplicón de 330 pb de DNA de micicrúculos de *T. cruzi* (Figura 6A). Por el contrario, en todas las muestras analizadas de ratones C57BL/6 la reacción de PCR fue negativa (Figura 6B).



**d) Análisis histológico:** La figura 7 muestra tejido cardíaco obtenido en el día 90 post-infección y teñido con hematoxilina-eosina. A diferencia del tejido cardíaco de ratones sanos, los grupos infectados presentaron signos de inflamación moderada y focalizada, además de presentar desorganización de las fibras cardíacas. Sin embargo, no se observaron diferencias evidentes entre las muestras obtenidas de animales inoculados con distintas cantidades de parásitos. Los ratones C57BL/6 no mostraron diferencias histológicas respecto del grupo control sano (datos no mostrados). Esto se relaciona

con la alta sobrevivencia, bajas parasitemias y a la ausencia de carga parasitaria detectable por PCR en el tejido cardiaco (Figuras 4-6).



**Figura 7. Los ratones BALB/c infectados con *T. cruzi* presentan signos de daño cardiaco en la etapa crónica de la infección.** Tinción Hematoxilina Eosina. Cortes histológicos de corazón de ratones BALB/c obtenidos en el día 90 post-infección. **(A)** Control sano; **(B)** ratones infectados con 250 parásitos; **(C)** ratones infectados con 500 parásitos; **(D)** ratones infectados con 1000 parásitos; **(E)** ratones infectados con 10.000 parásitos. Las imágenes son representativas de al menos 3 animales por experimento. Las cabezas de flecha indican presencia de desorganización de fibras cardiacas asociada a infiltrado inflamatorio focalizado.

De acuerdo a los datos presentados, podemos concluir que los ratones BALB/c infectados con la cepa Dm28c de *T. cruzi* desarrollaron:

- La *fase aguda* de la enfermedad caracterizada por una alta parasitemia y mortalidad.
- La *fase crónica*, en la cual se evidenciaron alteraciones morfológicas y presencia de DNA de *T. cruzi* en el tejido cardiaco.

Además, podemos indicar que el tamaño del inóculo no influye en la parasitemia, sobrevivencia, lesiones cardiacas y presencia del DNA parasitario en corazón. Finalmente, los ratones C57BL/6 no desarrollaron ninguna característica de la etapa crónica, por lo tanto, no son aptos para lograr los objetivos de la presente tesis.

Considerando estos resultados, se decidió inocular los ratones BALB/c con 500 tripomastigotes como tamaño adecuado del inóculo para establecer el modelo crónico de la infección por *Trypanosoma cruzi* y así proseguir con el estudio farmacológico.

### **Tratamiento Farmacológico: administración de aspirina (AAS) y/o benznidazol (Bz)**

Una vez elegido nuestro modelo de infección crónica, realizamos ensayos farmacológicos para establecer si la administración de AAS y Bz podrían alterar el curso del desarrollo de la etapa crónica. Para ello, se administró AAS, Bz o su combinación a partir del día 2 post-infección y durante 20 días. Las dosis utilizadas de AAS corresponden a una dosis baja (2 mg/kg/día) y una dosis alta (40 mg/kg/día), las cuales fueron elegidas para favorecer la inhibición de la síntesis de TXA2 o prostaglandinas, respectivamente. El tratamiento con Bz consistió en la dosis máxima efectiva reportada en la literatura (100 mg/kg/día) (Bustamante et al., 2007, Caldas 2008) y una dosis baja (30 mg/kg/día), con el objetivo de evaluar si en presencia de AAS se aumentan los efectos de Bz a baja dosis.

## **I. Efecto de AAS, Bz y su combinación sobre el curso de la infección en ratones BALB/c:**

En un primer lugar, se realizaron estudios orientados a determinar si los tratamientos administrados alteraban el desarrollo de la infección, mediante la evaluación de parámetros como:

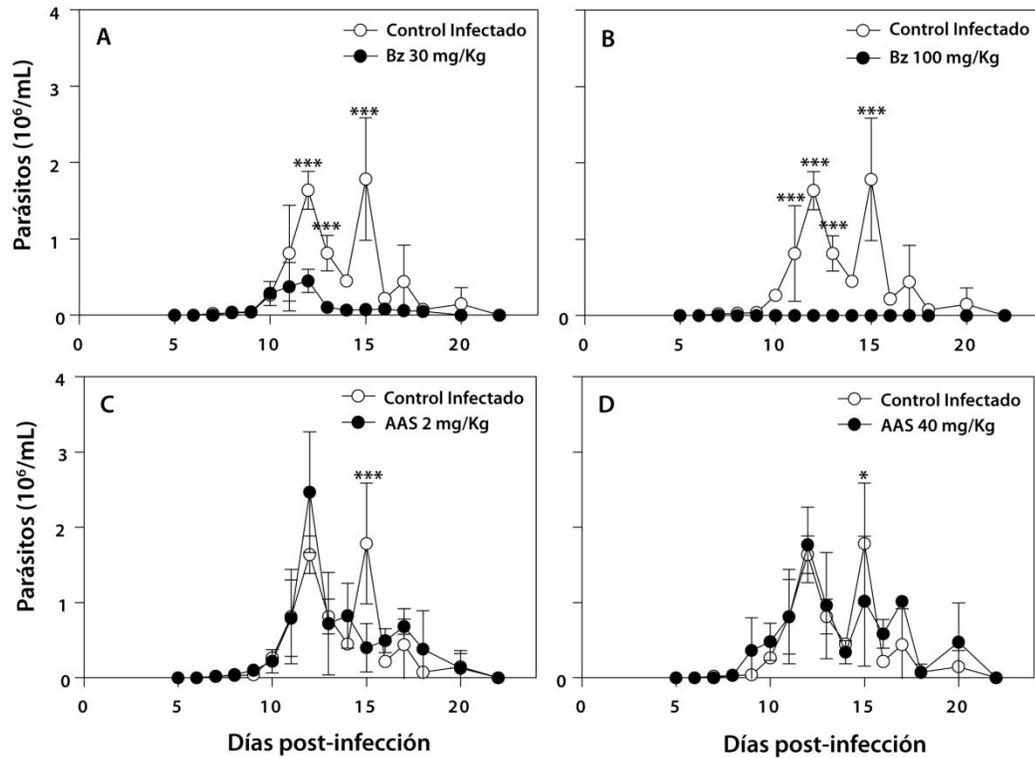
**a) Parasitemia**

**b) Sobrevida**

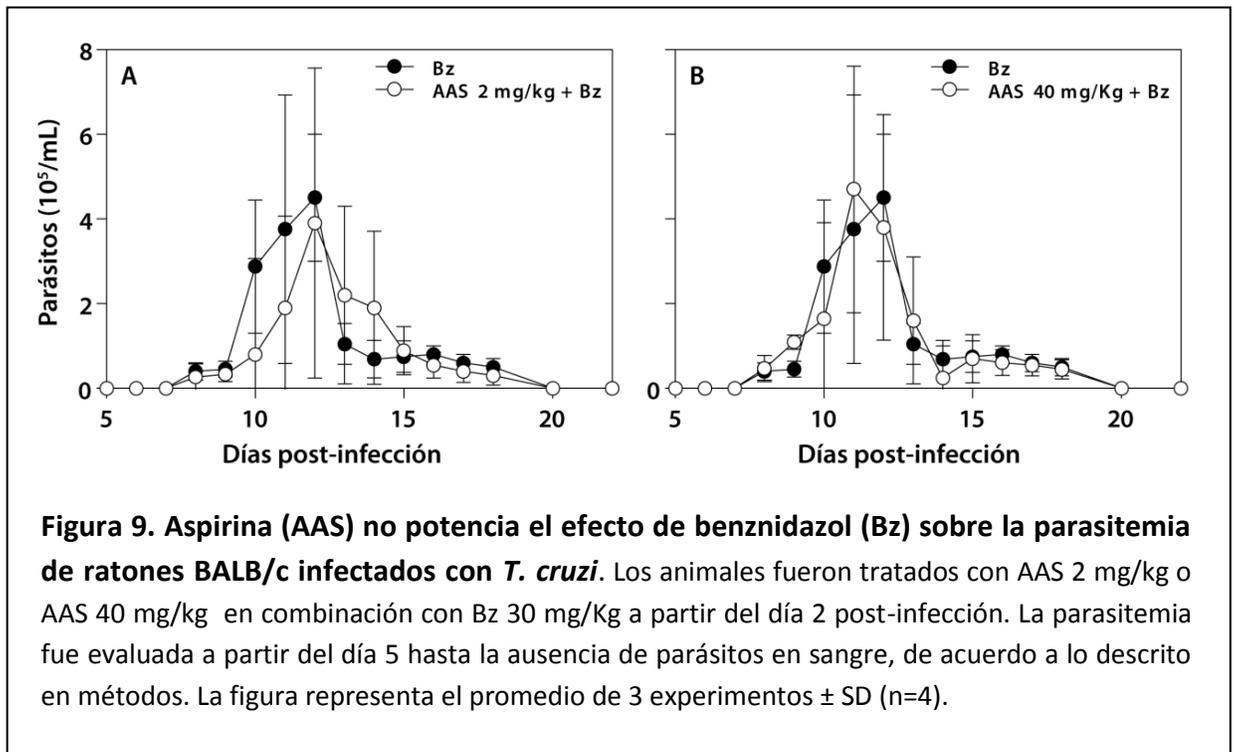
**c) Alteraciones histológicas del tejido cardiaco (nidios de amastigotes y miocarditis)**

**a) Parasitemia:** La figura 8 muestra el efecto del tratamiento temprano de AAS y Bz sobre los niveles de parasitemia. El tratamiento con Bz fue capaz de disminuir los niveles de parasitemia de manera significativa en ambas dosis utilizadas (Figura 8A, 8B). Por el contrario, el tratamiento con ambas dosis de AAS, sólo mostró diferencias significativas en el día 15 post-infección en comparación con el control infectado.

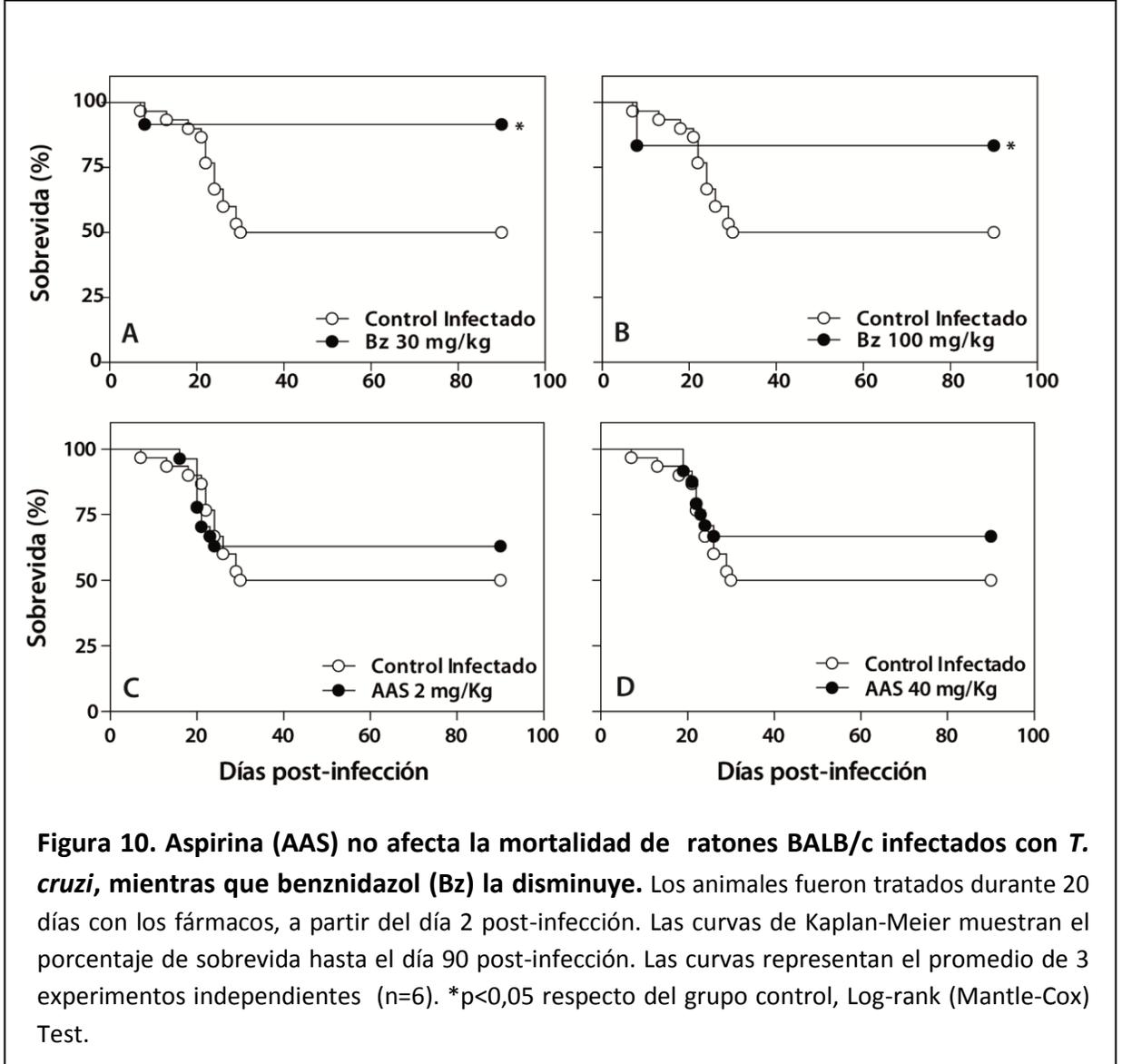
En nuestro modelo, los animales tratados con Bz 100 mg/Kg no presentaron niveles de parasitemia detectables mediante microscopía, lo que concuerda con los reportes que señalan esta dosis como la máxima efectiva en ratones (García et al., 2005; Bustamante et al., 2008; Caldas et al., 2008). Por lo tanto, para evaluar si en un tratamiento combinado, AAS podría modificar el efecto de Bz sobre la parasitemia, se realizó un estudio de combinación utilizando Bz 30 mg/Kg como referencia. La administración conjunta de AAS 2 mg/kg o 40 mg/kg con Bz 30 mg/kg no produjo cambios en el efecto de Bz, excepto en un leve retardo en la aparición de la parasitemia cuando se combinó con la dosis baja de AAS (Figura 9).



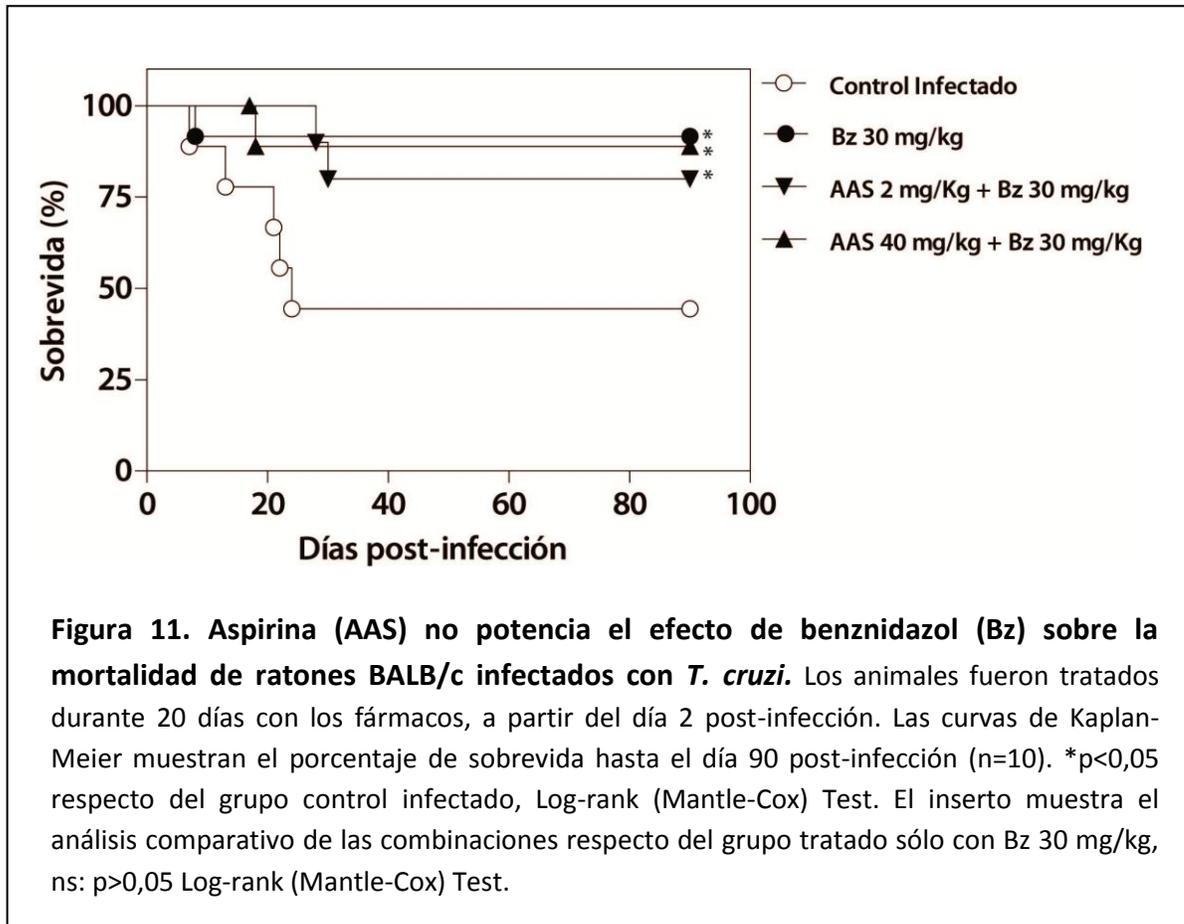
**Figura 8. Aspirina (AAS) no afecta la parasitemia de ratones BALB/c infectados con *T. cruzi*, mientras que benznidazol (Bz) la disminuye.** Los animales fueron tratados con AAS o Bz a partir del día 2 post-infección. La parasitemia fue evaluada a partir del día 5 hasta la ausencia de parásitos en sangre, de acuerdo a lo descrito en métodos. La figura representa el promedio de 3 experimentos  $\pm$  SD (n=4). \* $p < 0,05$ ; \*\* $p < 0,01$ ; \*\*\* $p < 0,001$  de acuerdo a ANOVA de dos vías.



**b) Sobrevida:** En el caso de los grupos tratados con Bz 30 y 100 mg/kg, la sobrevida de los animales infectados aumentó en un 91% y 84%, respectivamente ( $p < 0,05$ ). Al analizar si existen diferencias significativas entre ambos tratamientos, el análisis estadístico indicó que ambas dosis son igualmente efectivas ( $p > 0,05$ ) (Figura 10A-B). La sobrevida de los animales infectados con 500 parásitos y tratados con AAS 2 y 40 mg/kg, no fue estadísticamente diferente a la de los controles infectados ( $p > 0,05$ ) (Figura 10C-D).

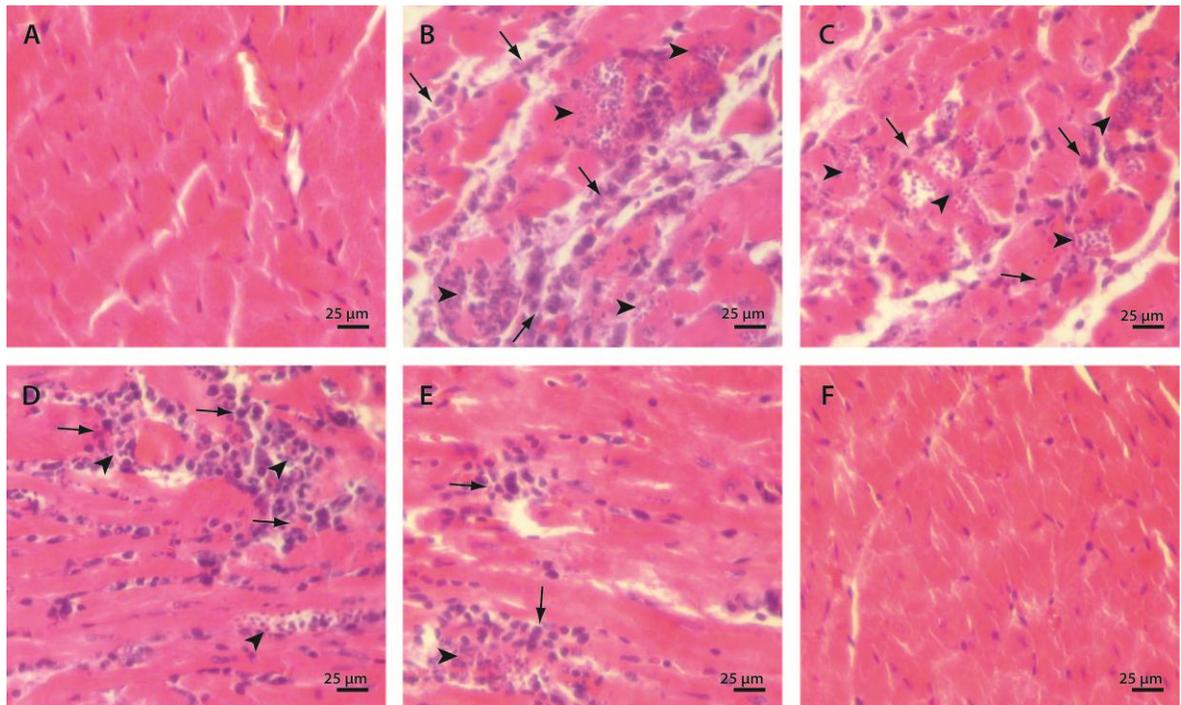


Posteriormente, se realizaron los estudios de combinación de AAS 2 mg/kg o 40 mg/kg con Bz 30 mg/kg. Ambos grupos tratados con las combinaciones tuvieron una supervivencia significativamente mayor en comparación con el control infectado; sin embargo, fueron igualmente efectivas al tratamiento sólo con Bz 30 mg/kg (p>0,05) (Figura 11).



**c) Histología del tejido cardíaco:** para poder evaluar el efecto de este tratamiento farmacológico sobre el desarrollo de las lesiones cardíacas, se realizaron estudios histológicos a dos tiempos: el primero, en el día 24 post-infección, que representa el término de la etapa sanguínea de la infección; y el segundo, en la etapa crónica (90 días post-infección). En el día 24 post-infección, se observó una evidente alteración de las fibras cardíacas acompañada de un intenso infiltrado inflamatorio generalizado (Figura 12B). Además, se identificaron nidos de amastigotes a lo largo de todo el tejido (12B). El tratamiento con AAS 2 y 40 mg/kg no afectó la presencia de nidos de

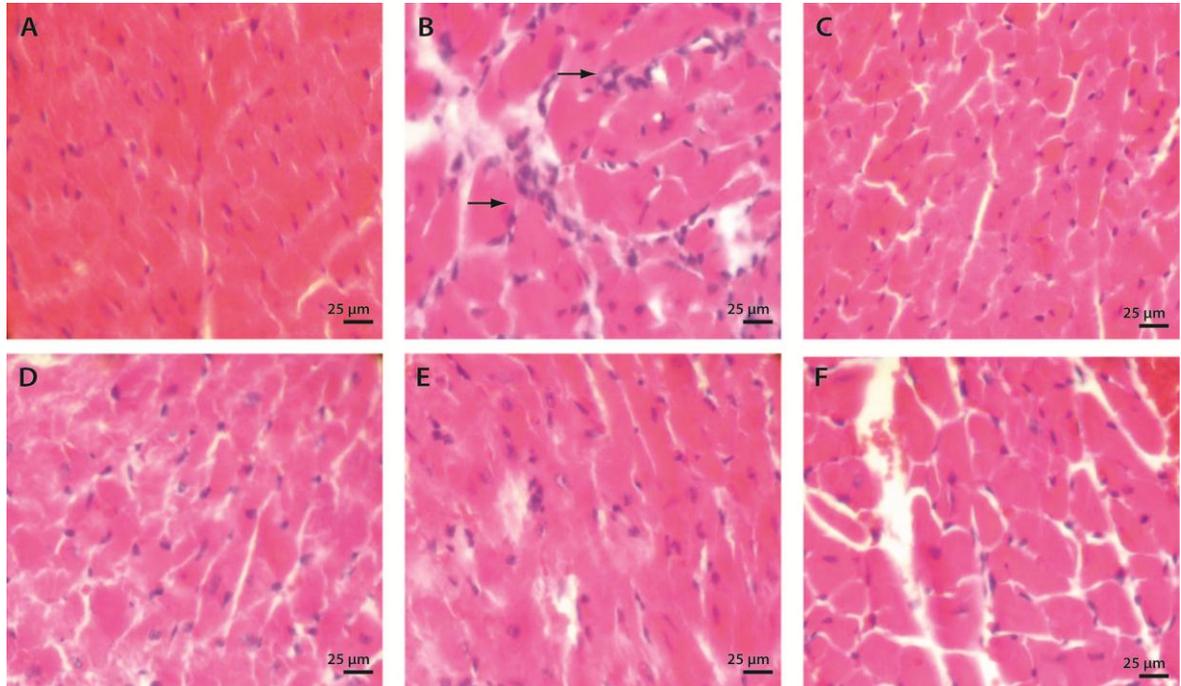
amastigotes en el tejido cardiaco de los ratones infectados; sin embargo, se observó un infiltrado inflamatorio menos intenso y más focalizado en comparación con el grupo control infectado (Figuras 12B-D). Por otro lado, el tratamiento con Bz 30 mg/kg disminuyó la extensión e intensidad de infiltrado inflamatorio a pesar de que aún fue posible visualizar la presencia de algunos nidos de amastigotes (Figura 12E). Bz 100 mg/kg no mostró diferencias histológicas con respecto al grupo control sano, ni tampoco presencia de nidos de amastigotes (Figura 12F).



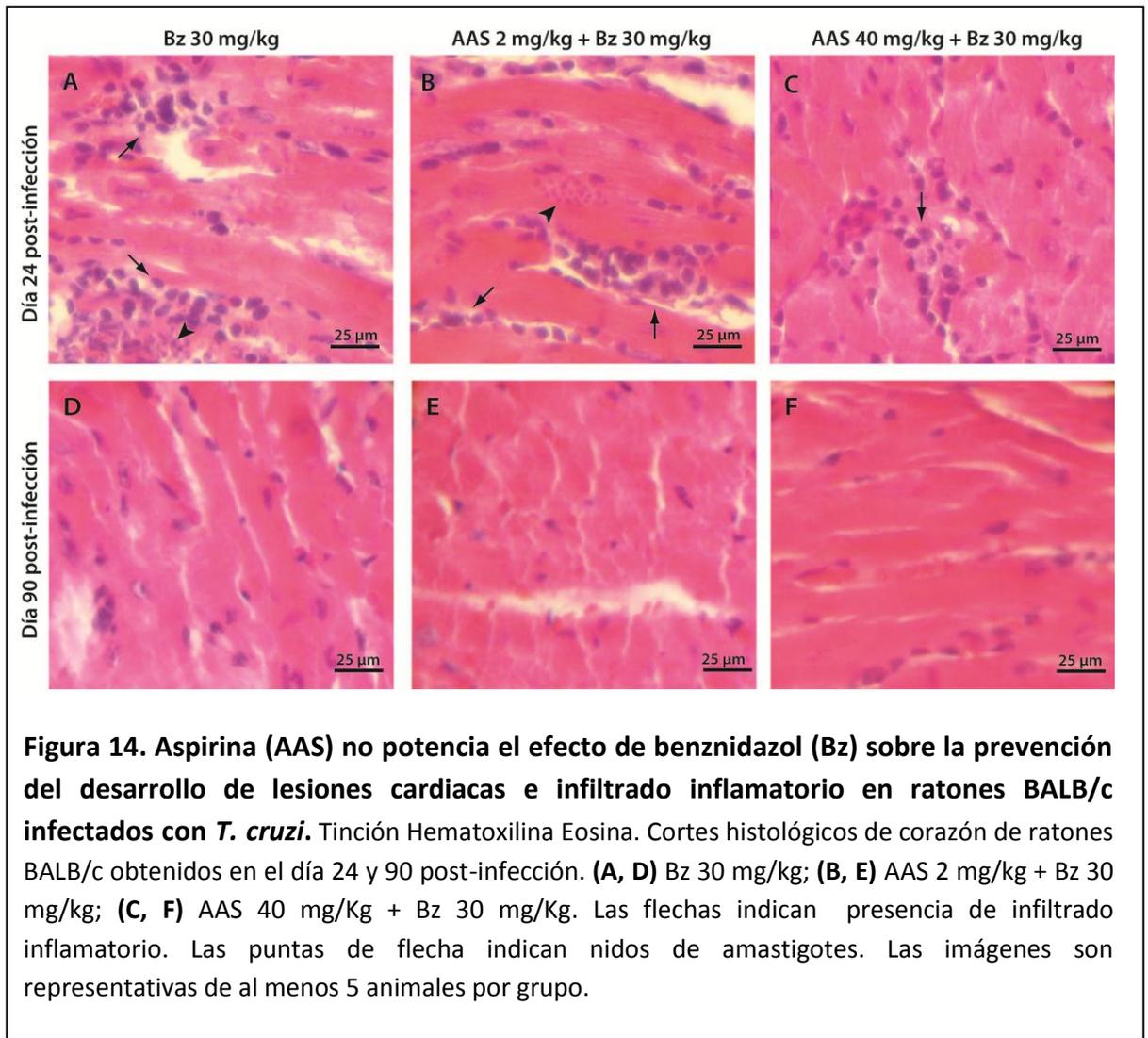
**Figura 12. Aspirina (AAS) y benznidazol (Bz) modulan la extensión del infiltrado inflamatorio y daño cardiaco en la etapa aguda de la infección con *T. cruzi*.** Tinción Hematoxilina Eosina. Cortes histológicos de corazón de ratones BALB/c obtenidos en el día 24 post-infección. **(A)** Control sano; **(B)** control infectado; **(C)** AAS 2 mg/kg; **(D)** AAS 40 mg/kg; **(E)** Bz 30 mg/kg; **(F)** Bz 100 mg/kg. Las puntas de flechas indican la presencia de amastigotes en el tejido. Las flechas indican zonas de infiltrado inflamatorio. Las imágenes son representativas de al menos 5 animales por grupo.

Durante la etapa crónica de la infección, los animales infectados con *T. cruzi* presentaron las lesiones características descritas previamente durante la estandarización de nuestro modelo. El tratamiento temprano con Bz 30 y 100 mg/kg es capaz de prevenir el desarrollo de las lesiones cardiacas de la etapa crónica (Figura 13A y 13B). Interesantemente, los grupos tratados con AAS 2 y 40 mg/Kg no presentaron focos de infiltrado inflamatorio ni desarreglo de las fibras cardiacas. Esto sugiere que, a pesar de no tener un efecto sobre parasitemia y la sobrevivencia de los animales, su administración temprana permite prevenir a largo plazo el desarrollo de las alteraciones del tejido cardiaco (Figura 13C y 13D).

Las muestras de tejido cardiaco de los animales tratados con la combinación de AAS y Bz presentaron: infiltrado inflamatorio focalizado, áreas del tejido sin compromiso estructural y presencia intermitente de pequeños nidos de amastigotes, que pueden o no estar circunscritos en el área de inflamación (Figura 14B y 14C); características similares a las del grupo tratado sólo con Bz 30 mg/kg (Figura 14A). En la etapa crónica, la combinación de AAS con Bz 30 mg/kg no presentó diferencias respecto del grupo tratado sólo con Bz (Figura 14D-F).



**Figura 13. Aspirina (AAS) y benznidazol (Bz) previenen el desarrollo de lesiones cardiacas presentes en la etapa crónica de la infección.** Tinción Hematoxilina Eosina. Cortes histológicos de corazón de ratones BALB/c obtenidos en el día 90 post-infección. **(A)** Control sano; **(B)** Control infectado donde se observa infiltrado inflamatorio focalizado; **(C)** grupo tratado con AAS 2 mg/Kg; **(D)** grupo tratado con AAS 40 mg/kg; **(E)** grupo tratado con Bz 30 mg/Kg; **(F)** grupo tratado con Bz 100 mg/Kg. Las flechas indican infiltrado inflamatorio focalizado. Las imágenes son representativas de al menos 5 animales por grupo.



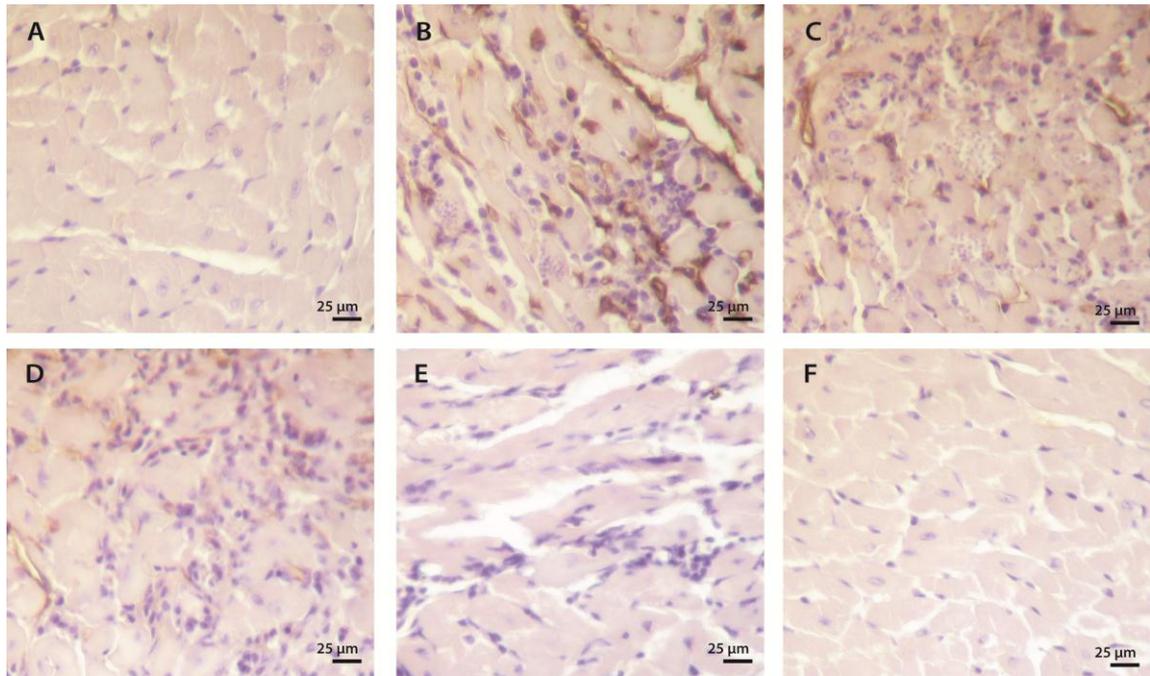
**Figura 14. Aspirina (AAS) no potencia el efecto de benznidazol (Bz) sobre la prevención del desarrollo de lesiones cardiacas e infiltrado inflamatorio en ratones BALB/c infectados con *T. cruzi*.** Tinción Hematoxilina Eosina. Cortes histológicos de corazón de ratones BALB/c obtenidos en el día 24 y 90 post-infección. **(A, D)** Bz 30 mg/kg; **(B, E)** AAS 2 mg/kg + Bz 30 mg/kg; **(C, F)** AAS 40 mg/Kg + Bz 30 mg/Kg. Las flechas indican presencia de infiltrado inflamatorio. Las puntas de flecha indican nidos de amastigotes. Las imágenes son representativas de al menos 5 animales por grupo.

## **II. Efecto de AAS, Bz y su combinación sobre el desarrollo de disfunción endotelial en ratones BALB/c infectados con *T. cruzi***

Uno de los mecanismos implicados en el desarrollo de la cardiomiopatía chagásica crónica (CCC) son las alteraciones en el endotelio. Por lo tanto, luego de establecer el efecto de ambos tratamientos sobre el curso de la infección, se evaluó la capacidad de AAS y Bz de prevenir el desarrollo de disfunción endotelial. Para ello se determinó:

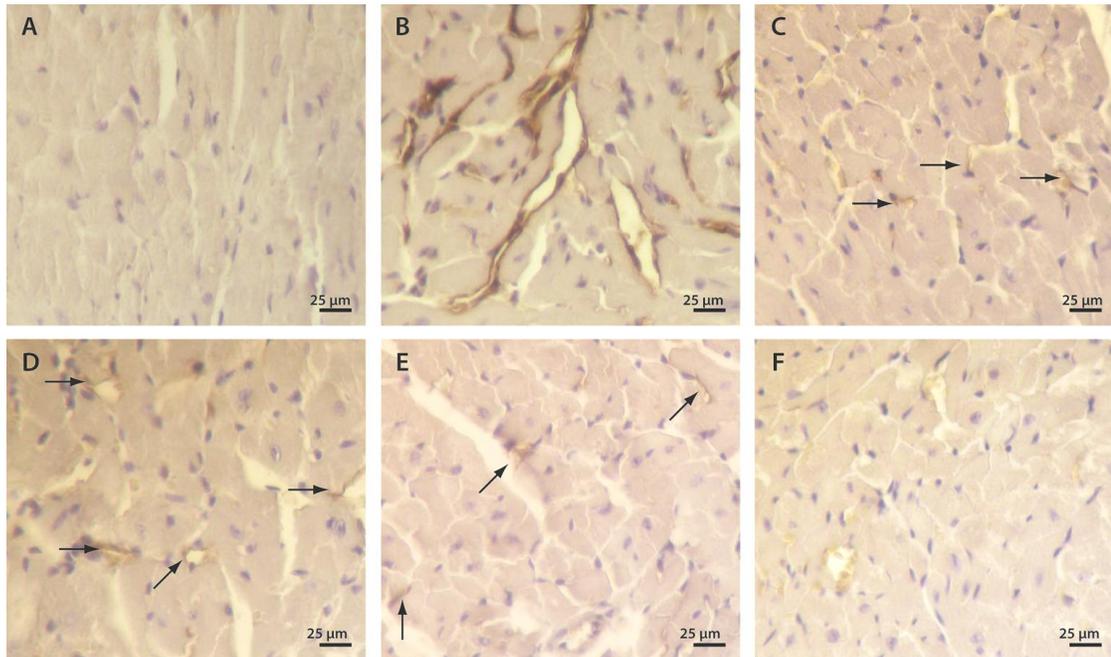
- a) El nivel de expresión de ICAM-1 en tejido cardiaco**
- b) Niveles plasmáticos de marcadores de disfunción endotelial**

**a) Expresión de ICAM-1 en tejido cardiaco:** la expresión de ICAM-1 en el tejido cardiaco de los ratones infectados con *T. cruzi*, se evaluó, como un marcador de daño endotelial. Los animales infectados presentaron una elevada expresión de ICAM-1 en la etapa aguda asociada a un intenso infiltrado inflamatorio (Figura 15A). Interesantemente, en las muestras obtenidas de ratones que recibieron el tratamiento con AAS 2 y 40 mg/kg, se observa una marcada disminución de la expresión ICAM-1 (Figura 15C y 15D). Esta observación concuerda con el efecto de este tratamiento sobre el infiltrado inflamatorio (Figura 12). El tratamiento con ambas dosis de Bz fue capaz de disminuir la expresión de ICAM-1 en el tejido, incluso hasta niveles no detectables (Figura 15E y 15F).

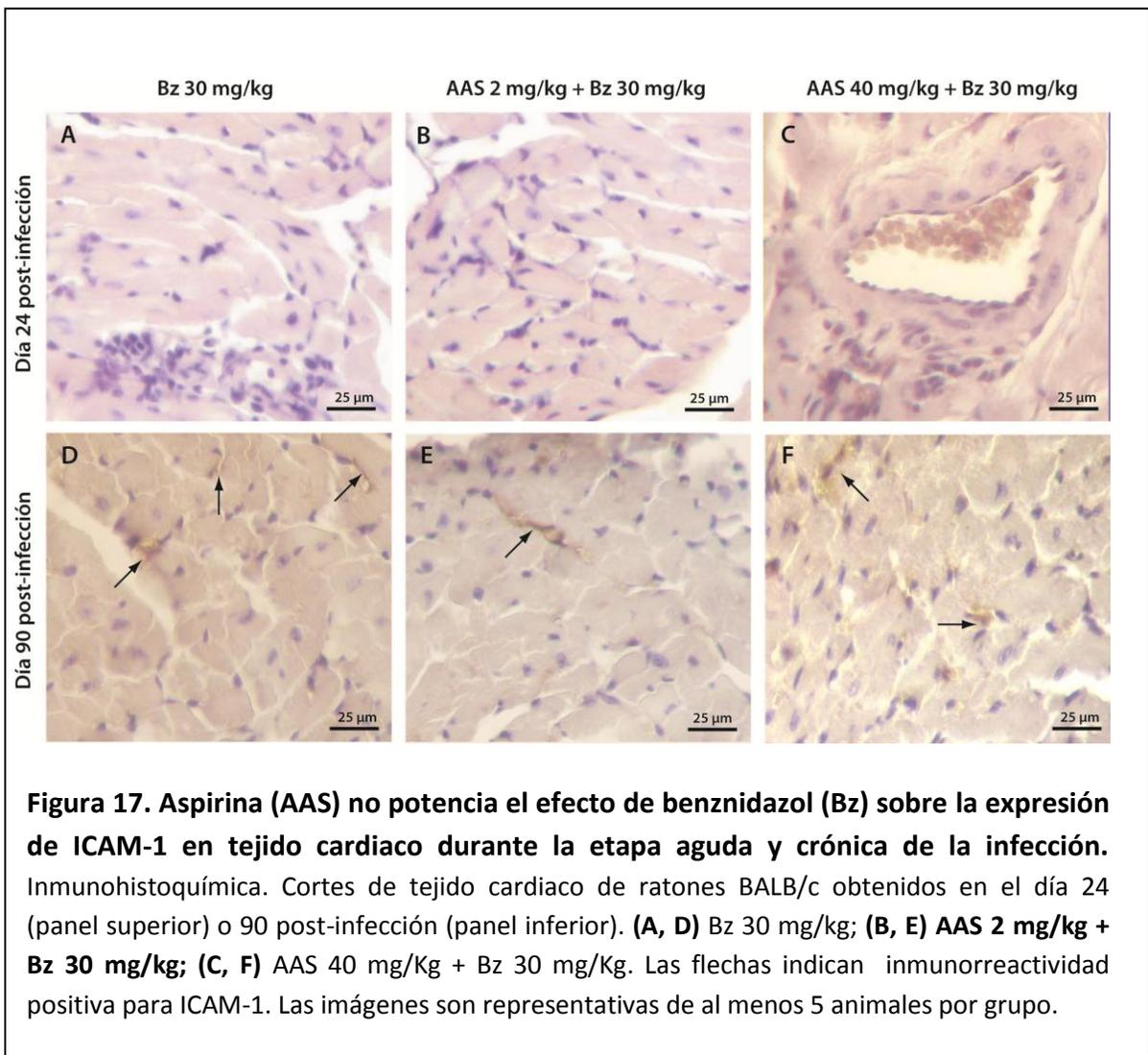


**Figura 15. Aspirina (AAS) y benznidazol (Bz) disminuyen la expresión de ICAM-1 en tejido cardiaco durante la etapa aguda de la infección.** Inmunohistoquímica de cortes histológicos de corazón de ratones BALB/c obtenidos en el día 24 post-infección. **(A)** Control sano; **(B)** Control infectado; **(C)** grupo tratado con AAS 2 mg/Kg; **(D)** grupo tratado con AAS 40 mg/kg; **(E)** grupo tratado con Bz 30 mg/Kg; **(F)** grupo tratado con Bz 100 mg/Kg. La coloración café indica inmunoreactividad positiva para ICAM-1. Las imágenes son representativas de al menos 5 animales por grupo.

En la etapa crónica de la infección, los animales infectados mantuvieron una expresión elevada de ICAM-1 en el tejido cardíaco, lo que indica que en nuestro modelo, la etapa crónica no sólo se caracteriza por presentar alteraciones en la organización de fibras cardíacas y por la presencia de infiltrado inflamatorio focalizado, sino que también por una disfunción endotelial sostenida (Figura 16B). Similar a lo observado durante la etapa aguda de la infección, los animales tratados con AAS o Bz, presentan una expresión de ICAM-1 disminuida en comparación con el grupo control infectado (Figura 16C-F). Sin embargo, a diferencia de lo observado en la etapa aguda, en el tratamiento con Bz 30 mg/kg esta disminución no es completa, ya que aún es posible observar pequeñas zonas con una leve inmunorreactividad para ICAM-1. El tratamiento combinado de AAS y Bz, no tuvo diferencias con el grupo tratado sólo con Bz 30 mg/kg (Figura 17).

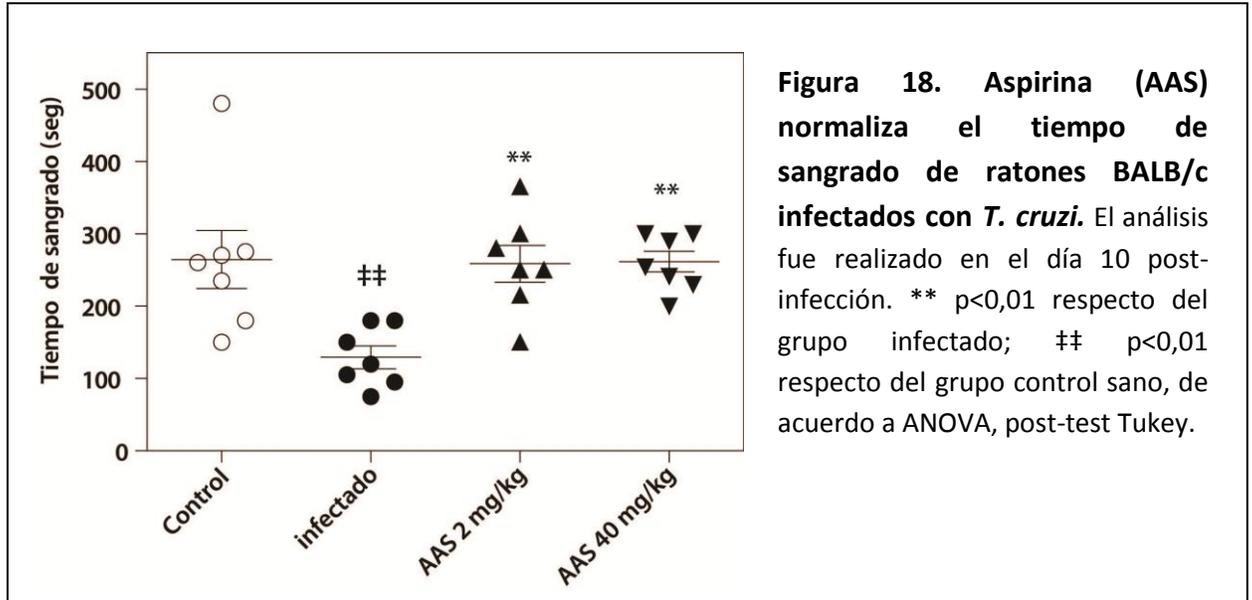


**Figura 16. Aspirina (AAS) y benznidazol (Bz) previenen el aumento de expresión de ICAM-1 en tejido cardiaco durante la etapa crónica de la infección.** Inmunohistoquímica de cortes histológicos de corazón de ratones BALB/c obtenidos en el día 90 post-infección. **(A)** Control sano; **(B)** Control infectado; **(C)** grupo tratado con AAS 2 mg/Kg; **(D)** grupo tratado con AAS 40 mg/kg; **(E)** grupo tratado con Bz 30 mg/Kg; **(F)** grupo tratado con Bz 100 mg/Kg. La coloración café indica inmunorreactividad positiva para ICAM-1. Las flechas indican inmunorreactividad positiva para ICAM-1 en los grupos tratados. Las imágenes son representativas de al menos 5 animales por grupo.



Los resultados presentados sugieren que AAS no tendría un efecto sobre el curso de la infección propiamente tal, ya que no disminuye los niveles de parasitemia, mortalidad ni la presencia de nidos de amastigotes en tejido cardiaco (Figuras 8-12). Sin embargo, en ambos grupos tratados con AAS disminuyó la expresión cardiaca de ICAM-1. Esto indica que en nuestro modelo, AAS a las dosis utilizadas, posee un efecto modulador de la expresión de ICAM-1 independiente de la presencia del parásito. La figura 18 muestra que en los ratones tratados con ambas dosis de AAS, el tiempo de sangrado es significativamente mayor al obtenido de los ratones infectados. Esto indicaría de manera indirecta, que a las dosis ensayadas, AAS podría tener un efecto importante

sobre la síntesis de TXA<sub>2</sub>, lo que explicaría en parte, el efecto de AAS sobre la expresión de ICAM-1.



**Figura 18. Aspirina (AAS) normaliza el tiempo de sangrado de ratones BALB/c infectados con *T. cruzi*.** El análisis fue realizado en el día 10 post-infección. \*\*  $p < 0,01$  respecto del grupo infectado; ##  $p < 0,01$  respecto del grupo control sano, de acuerdo a ANOVA, post-test Tukey.

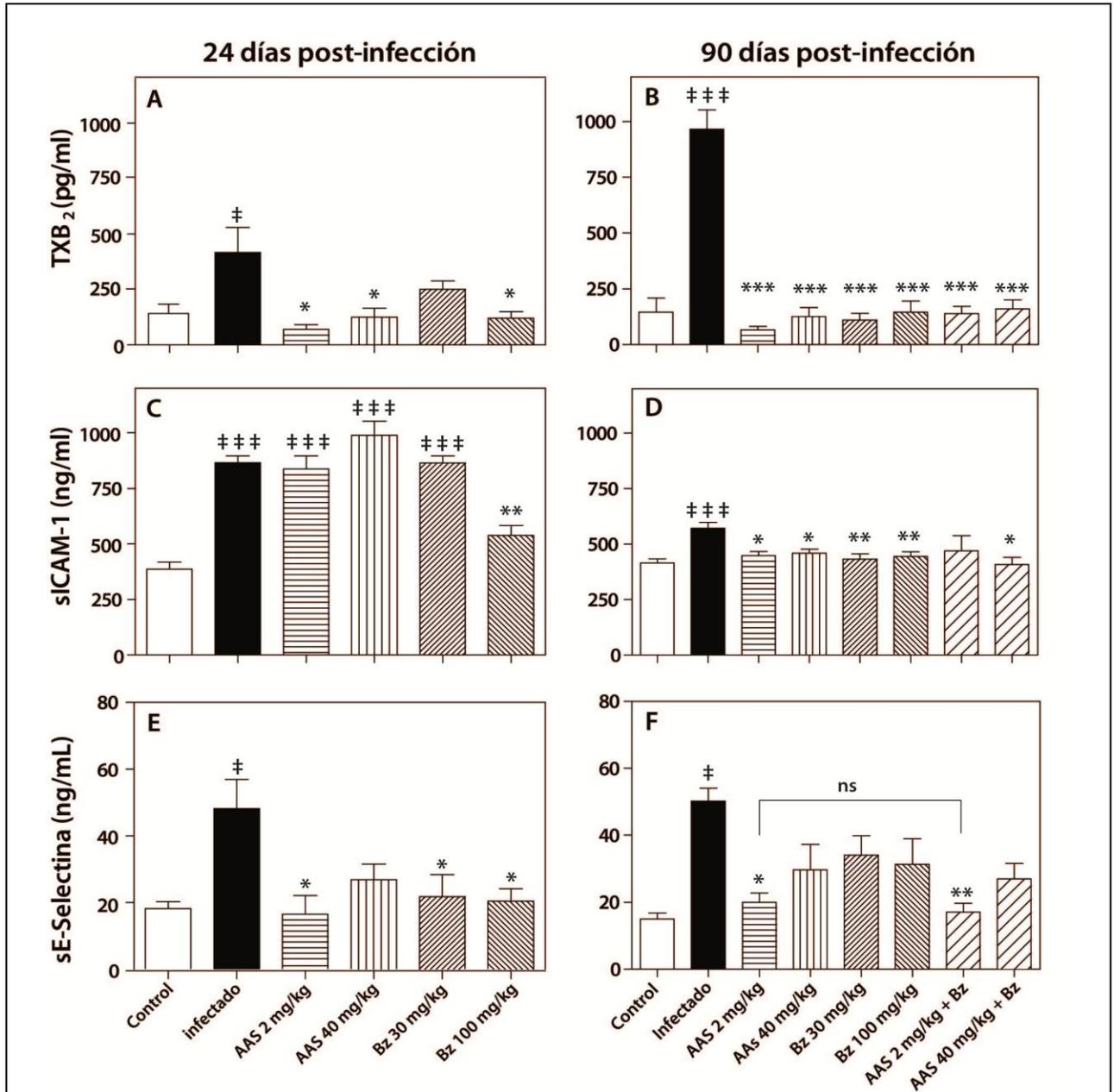
**b) Niveles plasmáticos de marcadores de disfunción endotelial:** Adicionalmente a la evaluación de la expresión tisular de ICAM-1, se determinaron los niveles plasmáticos de los marcadores de disfunción endotelial: TXA<sub>2</sub>, sICAM-1 y sE-selectina. Los animales infectados con *T. cruzi* presentaron niveles elevados de TXA<sub>2</sub> en el día 24 post-infección (Figura 19A); más aún, este incremento fue incluso mayor en la etapa crónica (Figura 19B). Esto concuerda con resultados previos de otros autores (Ashton et al., 2007). Durante la fase aguda (Figura 19A) y crónica (Figura 19B) de la infección, la administración de AAS 2 y 40 mg/kg disminuyó significativamente los niveles de TXA<sub>2</sub>, sin mostrar diferencias con los valores del grupo control sano ( $p > 0,05$ ). La administración de Bz 100 mg/kg también normalizó los niveles de TXA<sub>2</sub> hasta los del grupo control sano, tanto en la etapa aguda como crónica (Figuras 19A y 19B). Sin embargo, para la dosis baja de Bz (30 mg/kg), este efecto sólo fue significativo en el día 90 post-infección (Figura 19B).

Durante la etapa aguda de la infección, los niveles de sICAM-1 aumentaron a más del doble del valor control (Figura 19C,  $p < 0,05$ ). A pesar de que durante la etapa crónica los niveles de sICAM-1 tienden a disminuir en los animales infectados, siguen siendo significativamente mayores a los del grupo control sano (Figura 19D,  $p < 0,001$ ). Interesantemente, sólo el tratamiento con Bz 100 mg/kg fue capaz de disminuir los niveles de sICAM-1 durante la fase aguda de la infección (Figura 19C,  $p < 0,05$ ). Sin embargo, en el día 90 post-infección, los animales que fueron tratados con AAS en ambas dosis, presentaron niveles normalizados de sICAM-1 (Figura 19D,  $p < 0,05$ ). Este efecto también fue observado con los animales que recibieron Bz 30 o 100 mg/kg (Figura 19D,  $p < 0,01$ ).

Los niveles aumentados de sE-selectina en el día 24 post-infección, fueron normalizados por la dosis baja de AAS (2 mg/kg). A pesar de que en el grupo que recibió AAS 40 mg/kg se observa una disminución respecto del grupo control infectado, ésta no fue estadísticamente significativa (Figura 19E,  $p > 0,05$ ). Por otro lado, ambas dosis de Bz normalizaron los niveles plasmáticos de este marcador de disfunción endotelial (Figura 19E,  $p < 0,05$ ). Contrario a lo observado con  $\text{TXA}_2$  y sICAM-1, en la etapa crónica sólo se observó una disminución de los niveles plasmáticos de sE-selectina, en el grupo que recibió AAS 2 mg/kg (Figura 19F,  $p < 0,05$ ).

Por otro lado, se realizaron los estudios de combinación, evaluando los niveles de los marcadores de disfunción endotelial en la etapa crónica de la infección. Los resultados muestran que la co-administración de AAS 2 y 40 mg/kg con Bz 30 mg/kg no afectó los resultados obtenidos con cada uno de los fármacos por separado para los niveles de  $\text{TXA}_2$  (Figura 19B). Para sICAM-1, sólo la combinación con la dosis alta de AAS fue distinta del control infectado (Figura 19C). Finalmente, a pesar de observar una disminución importante en los valores de sE-selectina, con la combinación de AAS 40 mg/kg y Bz 30 mg/kg, esta disminución no fue estadísticamente significativa ( $p > 0,05$ ). Por otro lado, la combinación de AAS 2 mg/kg con Bz hizo más significativa aún la

disminución de sE-selectina respecto del grupo control infectado (Figura 19F,  $p < 0,01$ ). Sin embargo, esta diferencia entre el grupo tratado sólo con AAS 2 mg/kg y el grupo tratado con la combinación, no es estadísticamente significativa (Figura 19F; ns:  $p > 0,05$ ).



**Figura 19. Efecto normalizador de aspirina (AAS), benznidazol (Bz) y su combinación sobre los niveles plasmáticos de marcadores de disfunción endotelial.** Las muestras plasmáticas fueron obtenidas en el día 24 y 90 post-infección. Niveles plasmáticos de **(A, B)** TXB<sub>2</sub> (metabolito estable de TXA<sub>2</sub>); **(C, D)** sICAM-1; **(E, F)** sE-selectina. \*p<0.05, \*\*p<0.01, \*\*\*p<0.001, respecto del grupo control infectado; ‡p<0.05, ‡‡‡p<0.001, respecto del grupo control sano, de acuerdo a ANOVA, post-test Tukey. Las barras representan el promedio ± SD de al menos 3 experimentos independientes (n=5).

## RESUMEN DE RESULTADOS

### 1. Modelo de infección crónica:

Existen numerosos modelos de infección crónica de *T. cruzi*, los cuales varían tanto en el número de parásitos utilizados en el inóculo, cepa del parásito, cepa de los ratones y parámetros de cronicidad, por lo cual era importante poder establecer nuestro propio modelo (Basombrío et al, 1982; Marinho et al., 1999; Guarner et al., 2001; Soares et al., 2001; Huang et al., 2002; Marinho et al., 2004; De Souza et al., 2004; Cardoni et al., 2004; García et al., 2005).

Nuestros resultados mostraron que el número de parásitos (250 a 10.000 parásitos) utilizado en la infección de *T. cruzi* Dm28c a ratones BALB/c y C57BL/6 no alteró la supervivencia, la parasitemia ni las lesiones cardíacas en la etapa crónica de la enfermedad (Figuras 4-7). Así, se seleccionó un número de 500 parásitos para la inoculación de los animales y el desarrollo de los experimentos farmacológicos.

### 2. Daño microvascular *in vivo* generado por la cepa Dm28c de *T. cruzi* en ratones BALB/c:

**a) Morfología de la arquitectura vascular y del miocardio:** Los animales infectados con 500 parásitos presentaron lesiones características reportadas por otros autores en modelos de infección crónica (Figuras 12-14) (Basombrío et al., 1982; Marinho et al., 1999; García et al 2005).

**b) Expresión de ICAM-1 en tejido cardíaco:** de acuerdo a los datos presentados, hemos podido definir que en el tejido cardíaco de ratones BALB/c infectados con *T. cruzi*, ICAM-1 aumenta su expresión de forma importante en la etapa aguda y crónica de la infección (Figuras 15 y 16, respectivamente). Si bien en un inicio se propuso la evaluación de la expresión de VCAM-1 como parte de este objetivo, no fue posible

evidenciar un aumento en la expresión de VCAM-1 por técnicas inmunohistoquímicas o fluorescencia, en el tejido cardiaco de los ratones infectados (datos no mostrados).

**c) Niveles séricos de TXA<sub>2</sub>, sICAM-1 y sE-selectina:** En nuestro estudio, los niveles séricos de TXA<sub>2</sub> permanecen elevados durante la etapa aguda y crónica de la infección, sugiriendo un rol activo de este prostanoide en el desarrollo de la cardiomiopatía chagásica crónica, como lo han sugerido otros autores (Ashton et al, 2007). Los resultados obtenidos indican que, tanto sICAM-1 como sE-selectina, pueden utilizarse como marcadores del desarrollo de disfunción endotelial, junto a la evaluación de los niveles séricos de TXA<sub>2</sub>, en la infección con *T. cruzi* en ratones BALB/c, ya que aumentan significativamente sus niveles séricos tanto en la etapa aguda como crónica (Figura 19).

### **3. Efecto de la inhibición de la síntesis de prostaglandinas y tromboxanos, en ratones chagásicos crónicos tratados con aspirina.**

**a) Morfología y arquitectura del miocardio:** en los análisis histológicos, el tratamiento temprano con AAS logró disminuir la intensidad del infiltrado inflamatorio; sin embargo, no mostró un efecto sobre la presencia de nidos de amastigotes, lo que confirmaría que a las dosis de AAS utilizadas no existiría efecto tripanocida (Figuras 12 y 13).

**b) Expresión de ICAM-1:** El tratamiento con AAS fue capaz de disminuir la expresión de la molécula de adhesión ICAM-1, tanto en la etapa aguda como crónica a pesar de no contar con un efecto tripanocida (Figuras 15 y 16 respectivamente). Esto sugiere que el componente inflamatorio que produce la elevación de la expresión de ICAM-1 en el tejido cardiaco, puede ser modulado por la acción de AAS.

**c) Efecto de aspirina sobre marcadores de disfunción endotelial:** los datos presentados indican que la administración de AAS 2 y 40 mg/kg en los ratones

infectados con *T. cruzi* es capaz de normalizar los niveles de TXA<sub>2</sub> y sICAM-1 en la etapa crónica, incluso 60 días después haber finalizado el tratamiento (Figura 19). La administración de AAS 2 mg/kg fue capaz de disminuir los niveles plasmáticos de sE-selectina en la etapa crónica, mientras que la dosis mayor no fue distinta del grupo control infectado (Figura 19F)

#### **4. Eficacia del tratamiento con AAS, Bz y ambos en combinación, en ratones infectados crónicamente con la cepa Dm28c de *T. cruzi*.**

Los resultados obtenidos muestran que una dosis baja de Bz (30 mg/kg) es capaz de disminuir considerablemente la mortalidad de los animales infectados, sin mostrar diferencias significativas con el grupo tratado con Bz 100 mg/kg. Sin embargo, los ratones BALB/c que recibieron la dosis baja de Bz presentaron:

- Niveles de parasitemia detectables por microscopía
- Presencia de nidos de amastigotes en tejido cardiaco
- Focos de infiltrado inflamatorio.

**a) Parasitemia por análisis microscópico:** el tratamiento con AAS 2 y 40 mg/kg no tuvo efecto sobre los niveles de parasitemia en los animales infectados, a diferencia de lo observado con ambas dosis de Bz (Figura 8). La combinación de AAS con Bz 30 mg/kg no mostró un efecto superior al ejercido por el tratamiento único con Bz 30 mg/kg (Figura 9).

**b) Persistencia parasitaria en el tejido cardiaco:** Los análisis histológicos muestran que los animales tratados con AAS 2 y 40 mg/kg no son capaces de disminuir la persistencia parasitaria, ya que en estos ratones es posible detectar nidos de amastigotes al igual que en el grupo control infectado. Por el contrario, Bz 30 mg/kg disminuye la presencia del parásito en el tejido, mientras que en los ratones tratados con Bz 100 mg/kg no es posible detectar al parásito por esta técnica.

**c) Tiempo de sobrevida de los ratones:** Los animales infectados tratados con AAS 2 y 40 mg/kg no disminuyeron su mortalidad, a diferencia de lo observado con ambas dosis de Bz (Figura 10). Por otro lado, la combinación de AAS con Bz 30 mg/kg no tuvo un efecto mayor al obtenido con la administración de Bz 30 mg/kg.

## IV. DISCUSIÓN

La cardiopatía chagásica crónica sigue siendo considerada como una de las enfermedades cardíacas con peor pronóstico, cuando se compara con cardiopatías de otra etiología (Barbosa et al., 2011; Vilas Boas et al., 2012). La incidencia y prevalencia de la enfermedad ha disminuido, gracias a estrategias de salud pública como el control del vector y la prevención de la transmisión sanguínea. Sin embargo, en la actualidad no se cuenta con estrategias que aumenten la eficacia de la terapia antichagásica. Además, la creciente migración de la población desde zonas endémicas a regiones no endémicas, ha aumentado el riesgo de infección en países donde no se desarrollan los análisis de donantes de sangre de manera sistemática (WHO, 2010). Por lo tanto, comprender las bases fisiopatológicas de la cardiopatía chagásica crónica y la búsqueda de nuevos blancos y estrategias terapéuticas, ayudarán a mejorar el tratamiento de la enfermedad de Chagas, particularmente en la fase crónica de la enfermedad, donde actualmente los fármacos antichagásicos presentan un porcentaje de cura menor al 6% (Matta et al., 2012).

Durante la estandarización de nuestro modelo de infección, pudimos observar que la mortalidad de los animales alcanzó un 50% durante la etapa aguda y presentaron además altos niveles de parasitemia entre los días 5 a 24 post-infección (Figura 3). Esta es una característica observada en distintos modelos murinos, los cuales en general presentan elevados índices de mortalidad y altos niveles de parasitemia (Soares et al., 2001; Cardoni et al., 2004; De Souza et al., 2004). La principal limitación de los modelos murinos radica en que en el hombre, la mortalidad durante la etapa aguda es baja (1%). Sin embargo, el uso de estos modelos animales se ve fuertemente justificado para el estudio de la enfermedad de Chagas crónica, ya que los ratones presentan las 3 fases características de la enfermedad de Chagas: aguda, crónica asintomática y crónica

sintomática, esta última caracterizada por las alteraciones cardíacas (García et al., 2005; De Souza et al., 2004; Huang et al., 2002; Soares et al., 2001).

La contribución de las alteraciones microvasculares en el desarrollo de la enfermedad de Chagas crónica es bien conocida (Rossi y Ramos, 1996; Rossi et al., 2010). Se ha propuesto que parte de estas alteraciones estarían mediadas por un aumento en la expresión de moléculas de adhesión celular, favoreciendo la mantención de infiltrado inflamatorio en el tejido cardíaco (Lannes-Vieira et al., 2009; García-Alvarez et al., 2011). Por otro lado, el estado pro-agregante plaquetario que presentan los pacientes infectados crónicos, podría estar favorecido por la liberación de TXA<sub>2</sub>, el cual participa directamente en la activación de las plaquetas y en la expresión de moléculas de adhesión como ICAM-1, VCAM-1 y E-selectina (Caughey et al., 1997; Patrono et al., 2005; Nakahata, 2008). Si bien esta activación endotelial forma parte de una respuesta fisiológica, gatillada para el reclutamiento de células del sistema inmune, se ha descrito que el parásito utilizaría estos mecanismos para favorecer su entrada a las células del hospedero (Dias et al., 2008). Recientemente, se reportó que el amastigote de *T. cruzi* es capaz de sintetizar TXA<sub>2</sub> (Ashton et al., 2007). Por lo tanto, este podría ser uno de los mecanismos por los cuales el *Trypanosoma cruzi* puede promover el desarrollo de alteraciones microvasculares de manera directa.

Una de las principales preocupaciones relacionadas con el tratamiento de la enfermedad de Chagas, es la baja eficacia de los antichagásicos clásicos benznidazol y nifurtimox en la etapa crónica. Sin embargo, se ha recomendado tratar a los pacientes chagásicos crónicos con benznidazol. Esta indicación se justificaría al analizar la patogénesis y evolución de la enfermedad de Chagas, ya que se postula que la erradicación del parásito podría disminuir la presencia de focos de infiltrado inflamatorio, promover la regeneración tisular y revertir la fibrosis (Coura y Borges-Pereira, 2011). Por otro lado, se han reportado efectos variables de benznidazol sobre las lesiones cardíacas en diferentes modelos murinos, las cuales pueden ser atribuidas

a las distintas cepas de *T. cruzi* o ratones utilizadas y a los diferentes esquemas de tratamiento empleados (Bustamante et al., 2007; Caldas et al., 2008; García et al., 2005). Aunque las alteraciones microvasculares se han relacionado con el desarrollo de la cardiomiopatía chagásica, existe poca evidencia del efecto de benznidazol sobre la disfunción endotelial en la etapa crónica (Rossi et al., 2010; Laucella et al., 1999).

En nuestro modelo de infección, los animales infectados con *T. cruzi* presentaron niveles elevados de TXA<sub>2</sub>, sICAM-1 y sE-selectina, tanto en la etapa aguda como crónica. Estos resultados apoyan la evidencia del compromiso endotelial durante la cardiomiopatía chagásica crónica. Además, estos resultados sugieren que la determinación los niveles plasmáticos de sE-selectina, sICAM-1 y TXA<sub>2</sub>, podrían ser útiles en la evaluación de la progresión hacia un estado microvascular alterado en la enfermedad de Chagas y para evaluar la protección endotelial durante el tratamiento farmacológico de la infección. Al respecto, numerosos estudios en pacientes que presentan cardiopatías de diversa etiología han mostrado que los niveles plasmáticos de sE-selectina y sICAM-1 son marcadores útiles de la progresión de la disfunción endotelial y que su aumento es un factor de riesgo para síndromes coronarios agudos y muerte (Gross et al., 2012; Maggio et al., 2012; Wijnstok et al., 2000).

Los resultados presentados en este trabajo concuerdan con reportes previos sobre el efecto de la dosis máxima efectiva de benznidazol (100 mg/kg/día) en modelos de infección crónica; donde los animales tratados presentaron una alta sobrevivencia, bajos niveles de parasitemia, ausencia de nidos de amastigotes e infiltrado inflamatorio reducido en el tejido cardiaco (Bustamante et al., 2007; Caldas et al., 2008) (Figuras 8-13). Sin embargo, contrario a lo que se esperaba, la dosis baja de benznidazol (30 mg/kg) fue igualmente efectiva respecto del aumento de sobrevivencia de los ratones infectados, a pesar que esta dosis no eliminó completamente al parásito de la sangre ni del tejido cardiaco, durante la etapa aguda de la infección (figuras 8 y 12).

El tratamiento con benznidazol disminuyó el infiltrado inflamatorio y el desarreglo de las fibras cardíacas producidas por el parásito en el día 24 post-infección (Figura 12). Este efecto se mantuvo hasta la etapa crónica, incluso con la dosis baja ensayada (Figura 13). Estos resultados se relacionan con la expresión de ICAM-1 en el tejido cardíaco y con la activación endotelial. La relación entre el tejido cardíaco inflamado y la expresión aumentada de ICAM-1, ha sido reportada previamente en pacientes con distinto grado de miocarditis y diferente etiología (Ino et al., 1997). Nuestros resultados muestran que controles infectados mostraron niveles elevados de ICAM-1 durante la etapa aguda y crónica, mientras que los animales tratados mostraron una expresión baja o nula de ICAM-1 (Figura 15 y 16).

Varios estudios han reportado niveles plasmáticos aumentados de sVCAM-1 y CD44 (ligando de fibronectina y ácido hialurónico) durante la etapa aguda de la infección, mientras que la isoforma soluble de P-selectina (sP-Selectina) ha sido asociada con la severidad de la etapa crónica (Lannes-Vieira et al., 2009; Laucella et al., 1999). Durante la activación endotelial, en respuesta a estímulos inflamatorios, el endotelio aumenta la expresión de ICAM-1, VCAM-1 y E-Selectina, entre otras moléculas. Estas moléculas tienen en común que su expresión está controlada en parte, por el eje  $\text{IKK-}\beta/\text{I}\kappa\text{B}/\text{NF-}\kappa\text{B}$  y cuya activación se asocia con disfunción endotelial, cardiomiopatía y falla cardíaca (Maier et al, 2012). La administración de benznidazol durante la etapa temprana de la enfermedad, normalizó los niveles plasmáticos de  $\text{TXA}_2$  y sICAM-1 y sE-Selectina, efecto que persistió incluso 60 días después de la última dosis administrada de los fármacos (Figura 19). La erradicación del parásito con benznidazol eliminaría cualquier fuente externa  $\text{TXA}_2$ . Sin embargo, el efecto de la dosis baja de Bz (30 mg/kg) sobre los niveles de  $\text{TXA}_2$ , sugiere que la eliminación del parásito no es el único mecanismo que explica la normalización de marcadores de disfunción endotelial. Probablemente, otros mecanismos independientes de la actividad tripanocida podrían estar involucrados, como por ejemplo, la modulación de moléculas pro-inflamatorias. Al respecto,

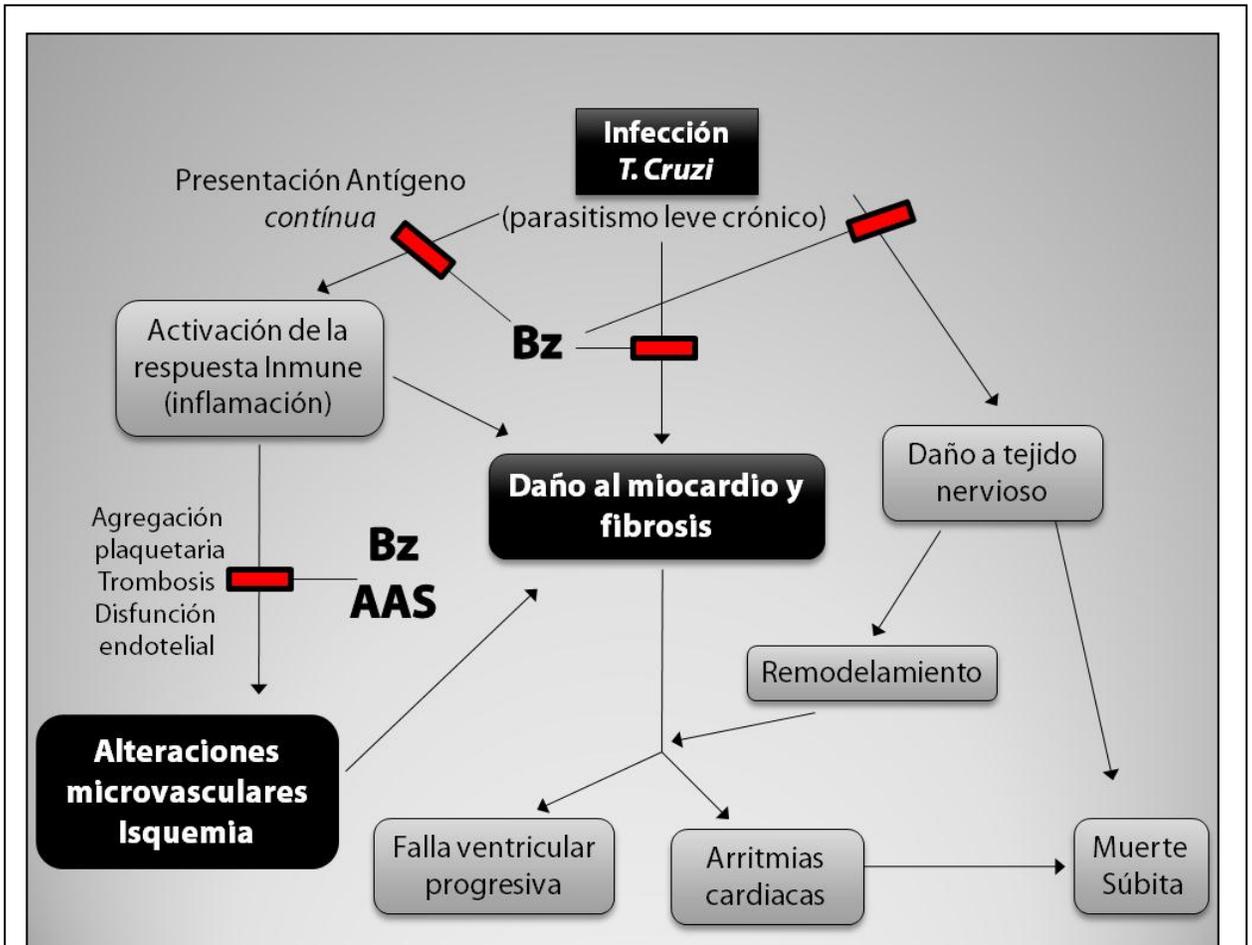
recientemente se ha reportado que benznidazol posee propiedades antiinflamatorias a través de la inhibición de NF- $\kappa$ B (Manarin et al., 2010; Ronco et al., 2011). Esto explicaría por qué una dosis incapaz de erradicar el parásito, previene el desarrollo de la disfunción endotelial en nuestro modelo.

Por otro lado, las dos dosis de AAS evaluadas en este estudio fueron capaces de prevenir el desarrollo de la disfunción endotelial, sin presentar efecto alguno sobre las parasitemias o presencia de amastigotes en el tejido cardiaco (Figuras 8 y 12). Esto reafirma la idea, de que una modulación oportuna de la respuesta inflamatoria, puede tener un efecto a largo plazo en el desarrollo de la cardiopatía chagásica crónica, a pesar de no erradicar al parásito. De esta manera, la actividad de AAS estaría relacionada con su capacidad de inhibir la síntesis de TXA<sub>2</sub> a nivel plaquetario y endotelial (Figuras 15, 16, 18, 19). Por otro lado, la activación endotelial podría ser consecuencia de la producción aumentada de tromboxano A<sub>2</sub> por el propio parásito (Ashton et al., 2007). Sin embargo, la administración de AAS fue capaz de normalizar los niveles plasmáticos de TXB<sub>2</sub>. Por lo tanto, en nuestro modelo, es probable que la fuente primaria de TXA<sub>2</sub> sea el huésped y no el parásito. Por otro lado, los ratones presentaron respuestas diferentes frente a la administración de AAS ya sea en presencia o ausencia de la infección. Es así como la administración de AAS a ratones sanos aumentó el tiempo de sangrado de los animales (datos no mostrados). Sin embargo, el hecho de que AAS sólo tenga un efecto normalizador del tiempo de sangrado en ratones infectados, sugiere que podría existir otra fuente de TXA<sub>2</sub> participando en el aumento de la agregación plaquetaria (Figura 18). Alternativamente y de forma similar a lo planteado para Bz, el tratamiento con AAS podría modular la expresión de moléculas de adhesión al inhibir la síntesis de TXA<sub>2</sub>, el cual se ha demostrado que es capaz de aumentar la expresión de ICAM-1 por medio de la activación de su receptor TP (Ishizuka et al., 1998).

## CONCLUSIONES

En conclusión, el tratamiento con AAS y Bz en todas las dosis utilizadas, moduló el desarrollo de la disfunción endotelial en nuestro modelo de infección crónica. Además, independientemente de la actividad tripanocida, tanto AAS como Bz previnieron el daño cardíaco presente en los animales infectados en la etapa crónica de la infección con *T. cruzi*. De acuerdo a lo postulado por diversos autores, esto concordaría con la idea de que la disfunción endotelial, forma parte de uno de los mecanismos patogénicos importantes involucrados en el desarrollo de la cardiopatía chagásica crónica (Figura 20). La intervención farmacológica del proceso inflamatorio asociado con la activación endotelial, es capaz de otorgar un efecto protector incluso a largo plazo, ya que en nuestro modelo los efectos fueron evidentes incluso 60 días después del fin del tratamiento.

Volviendo a la hipótesis de este trabajo, podemos decir que ésta se cumple de forma parcial. Aspirina, a pesar de prevenir el desarrollo de alteraciones microvasculares no fue capaz de potenciar a benznidazol a las dosis utilizadas. Sin embargo, aun cuando no fue posible observar esta potenciación, no descartamos la posibilidad de que a dosis menores de Bz este efecto sí sea observable. Independientemente del hecho de que a las dosis utilizadas AAS no disminuyera la mortalidad, este fármaco sí fue capaz de disminuir la disfunción endotelial, el cual es un factor de riesgo importante para el desarrollo de eventos cardiovasculares. Es así como la combinación de ambos fármacos permitiría diseñar estrategias con dosis aún menores de Bz, con el objetivo de prevenir los efectos adversos asociados con este fármaco antichagásico.



**Figura 20. Benznidazol y aspirina modulan el desarrollo de la cardiopatía chagásica crónica al prevenir las alteraciones microvasculares asociadas a la disfunción endotelial.** La figura muestra algunos de los mecanismos aceptados que contribuyen a la progresión hacia el daño cardíaco y cardiopatía chagásica crónica. Benznidazol podría modular la patogénesis directamente mediante la erradicación del parásito y posiblemente a través de sus efectos antiinflamatorios. Aspirina es capaz de prevenir la disfunción endotelial mediante su acción antiinflamatoria.

## V. REFERENCIAS

**Abdalla** GK, Faria GE, Silva KT, Castro EC, Reis MA, Michelin MA. (2008) *Trypanosoma cruzi*: the role of PGE2 in immune response during the acute phase of experimental infection. *Exp Parasitol.* 118(4): 514-521.

**Alfranca** A, Iñiguez MA, Fresno M, Redondo JM. (2006) Prostanoid signal transduction and gene expression in the endothelium: role in cardiovascular diseases. *Cardiovasc Res.* 70(3):446-5

**Andersson** J. (2004) Molecular diagnosis of experimental Chagas' disease. *Trends Parasitol.* 20(2): 52-53.

**Araújo-Jorge** TC, Waghbi MC, Soeiro MC, Keramidas M, Bailly S, Feige J (2008) Pivotal role for TGF- $\beta$  in infectious heart disease: The case of *Trypanosoma cruzi* infection and consequent Chagasic myocardopathy. *Cytokine Growth Factor Rev.* 19: 405-413.

**Ashton** AW, Mukherjee S, Nagajyothi FN, Huang H, Braunstein VL, Desruisseaux MS, Factor SM, Lopez L, Berman JW, Wittner M, Scherer PE, Capra V, Coffman TM, Serhan CN, Gotlinger K, Wu KK, Weiss LM, Tanowitz HB. (2007) Thromboxane A2 is a key regulator of pathogenesis during *Trypanosoma cruzi* infection. *J Exp Med.* 204(4): 929-940.

**Barbosa** AP, Cardinali-Neto A, Otaviano AP, da Rocha BF, Bestetti RB (2011) Comparison of Outcome between Chagas Cardiomyopathy and Idiopathic Dilated Cardiomyopathy. *Arq Bras Cardiol.* 97(6): 517-525

**Barrera** YK, Guevara JM, Pavía PX, Montilla M, Nicholls RS, Parra E, Puerta CJ. (2008) Evaluación de las pruebas de PCR TcH2AF-R y S35-S36 para la detección de *Trypanosoma cruzi* en tejido cardiaco de ratón. *Biomedica.* 28(4):616-26

**Bartel** LC, Montalto de Mecca M, Rodriguez de Castro C, Bietto F, Castro JA. (2010) Metabolization of nifurtimox and benznidazole in celular fractions of rat mammary tissue. *Hum Exp Toxicol.* 29(10): 813-822

**Basombrio** MA, Besuschio S (1982) *Trypanosoma cruzi* Culture Used as Vaccine to Prevent Chronic Chagas' Disease in Mice. *Infection and Immunity* 36: 351-356.

**Belhassen** L, Pelle G, Dubois-Rande JL, Adnot S. (2003) Improved endothelial function by the thromboxane A2 receptor antagonist S 18886 in patients with coronary artery disease treated with aspirin. *J Am Coll Cardiol.* 41(7): 1198-1204.

**Bern C**, Martin DL, Gilman RH. (2011) Acute and Congenital Chagas Disease. *Adv Parasitol.* 75: 19-47.

**Bulckaen H**, Prévost G, Boulanger E, Robitaille G, Roquet V, Gaxatte C, Garçon G, Corman B, Gosset P, Shirali P, Creusy C, Puisieux F (2008) Low-dose aspirin prevents age-related endothelial dysfunction in a mouse model of physiological aging *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* 294: H1562-H1570.

**Bustamante JM**, Presti MS, Rivarola HW, Fernández AR, Enders JE, Fretes RE, Paglini-Oliva P. (2007) Treatment with benznidazole or thioridazine in the chronic phase of experimental Chagas' disease improves cardiopathy. *Int J Antimicrob Agents.* 29(6): 733-737.

**Caldas IS**, Talvani A, Caldas S, Carneiro CM, de Lana M, da Matta Guedes PM, Bahia MT. (2008) Benznidazole therapy during acute phase of Chagas' disease reduces parasite load but does not prevent chronic cardiac lesions. *Parasitol Res.* 103: 413-421.

**Cardoni RL**, Antúnez MI. (2004) Circulating levels of cyclooxygenase metabolites in experimental *Trypanosoma cruzi* infections. *Mediators Inflamm.* 13(4): 235-240.

**Castro JA**, de Mecca MM, Bartel LC. (2006) Toxic side effects of drugs used to treat Chagas' disease (American trypanosomiasis). *Hum Exp Toxicol.* 25(8): 471-479.

**Caughey**, GE, Pouliot M, Cleland LG, James MJ. (1997) Regulation of tumor necrosis factor- $\alpha$  and IL-1 $\beta$  synthesis by thromboxane A<sub>2</sub> in nonadherent human monocytes. *J. Immunol.* 158: 351-358.

**Coura JR**, Borges-Pereira J. (2011) Chronic phase of Chagas disease: why should it be treated? A comprehensive review. *Mem Inst Oswaldo Cruz.* 106(6): 641-645.

**Cyrus T**, Sung S, Zhao L, Funk CD, Tang S, Praticò D. (2002) Effect of Low-Dose Aspirin on Vascular Inflammation, Plaque Stability, and Atherogenesis in Low-Density Lipoprotein Receptor-Deficient Mice. *Circulation* 106: 1282-1287.

**Danese S**, Dejana E, Fiocchi C. (2007) Immune regulation by microvascular endothelial cells: directing innate and adaptive immunity, coagulation, and inflammation. *J Immunol.* 178(10): 6017-22.

**D'Avila H**, Freire-de-Lima CG, Roque NR, Teixeira L, Barja-Fidalgo C, Silva AR, Melo RC, Dosreis GA, Castro-Faria-Neto HC, Bozza PT. (2011) Host cell lipid bodies triggered by *Trypanosoma cruzi* infection and enhanced by the uptake of apoptotic cells are associated with prostaglandin E<sub>2</sub> generation and increased parasite growth. *J Infect Dis.* 204(6): 951-61.

**De Souza** EM, Araújo-Jorge TC, Bailly C, Lansiaux A, Batista MM, Oliveira GM, Soeiro MNC (2003) Host and parasite apoptosis following *Trypanosoma cruzi* infection in *in vitro* and *in vivo* models. *Cell Tissue Res.* 314: 223-235.

**De Souza** AP, Tanowitz HB, Chandra M, Shtutin V, Weiss LM, Morris SA, Factor SM, Huang H, Wittner M, Shirani J, Jelicks LA. (2004) Effects of early and late verapamil administration on the development of cardiomyopathy in experimental chronic *Trypanosoma cruzi* (Brazil strain) infection. *Parasitol Res.* 92(6): 496-501

**Dias** WB, Fajardo FD, Graça-Souza AV, Freire-de-Lima L, Vieira F, Girard MF, Bouteille B, Previato JO, Mendonça-Previato L, Todeschini AR. (2008) Endothelial cell signalling induced by trans-sialidase from *Trypanosoma cruzi*. *Cell Microbiol.* 10(1): 88-99.

**DosReis** GA, (2011) Evasion of immune responses by *Trypanosoma cruzi*, the etiological agent of Chagas disease. *Braz J Med Biol Res.* 44(2): 84-90.

**Factor** SM, Cho S, Wittner M, Tanowitz H. (1985) Abnormalities of the coronary microcirculation in acute murine Chagas' disease. *Am J Trop Med Hyg.* 34(2): 246-253.

**Faúndez** M, López-Muñoz R, Torres G, Morello A, Ferreira J, Kemmerling U, Orellana M, Maya JD. (2008) Buthionine sulfoximine has anti-*Trypanosoma cruzi* activity in a murine model of acute Chagas' disease and enhances the efficacy of nifurtimox. *Antimicrob Agents Chemother.* 52(5):1837-9.

**Fiorelli** AI, Stolf NA, Honorato R, Bocchi E, Bacal F, Uip D, Strabelli T, Issa V, Amato VA, Fiorelli LR, Oliveira SA. (2005) Later evolution after cardiac transplantation in Chagas' disease. *Transplant Proc.* 37(6): 2793-2798.

**Freire-de-Lima** CG, Xiao YQ, Gardai SJ, Bratton DL, Schiemann WP, Henson PM. (2006) Apoptotic cells, through transforming growth factor-beta, coordinately induce anti-inflammatory and suppress pro-inflammatory eicosanoid and NO synthesis in murine macrophages. *J Biol Chem.* 281(50): 38376-8384.

**Freire-de-Lima**, CG, Nascimento, DO, Soares, MB, Bozza, PT, Castro-Faria-Neto, HC, de Mello, FG, DosReis, GA, Lopes, MF. (2000) Uptake of apoptotic cells drives the growth of a pathogenic trypanosome in macrophages. *Nature.* 13;403(6766): 199-203.

**Garcia** S, Ramos CO, Senra JFV, Vilas-Boas F, Rodrigues MM, Carvalho ACC, Ribeiro-dos-Santos R, Soares MBP. (2005) Treatment with benznidazole during the chronic phase of experimental Chagas' disease decreases cardiac alterations. *Antimicrob Agents Chemother.* 49: 1521-1528.

**García-Álvarez** A, Sitges M, Heras M, Poyatos S, Posada E, Pinazo MJ, Regueiro A, Gascon J, Sanz G. **(2011)** Endothelial function and high-sensitivity C-reactive protein levels in patients with Chagas disease living in a nonendemic area. *Rev Esp Cardiol.* 64(10): 891-6.

**Gutierrez** FRS, Guedes PM, Gazzinelli RT, Silva JS. **(2009)** The role of parasite persistence in pathogenesis of Chagas heart disease. *Parasite Immunol.* 31:673-685.

**Hasslocher-Moreno** AM, do Brasil PE, de Sousa AS, Xavier SS, Chambela MC, Sperandio da Silva GM. **(2012)** Safety of benznidazole use in the treatment of chronic Chagas' disease. *J Antimicrob Chemother.* 67(5):1261-6

**Herrera** RN, Díaz de Amaya EI, Pérez RC, Turoni C, Marañón R, Berman SG, Luciardi HL, Coviello A, Peral de Bruno M. **(2011)** Inflammatory and Prothrombotic Activation With Conserved Endothelial Function in Patients With Chronic, Asymptomatic Chagas Disease. *Clin Appl Throm Hem.* 17(5): 502-507.

**Hideko Tatakihara** VL, Cecchini R, Borges CL, Malvezi AD, Graça-de Souza VK, Yamada-Ogatta SF, Rizzo LV, Pinge-Filho P. **(2008)** Effects of cyclooxygenase inhibitors on parasite burden, anemia and oxidative stress in murine *Trypanosoma cruzi* infection. *FEMS Immunol Med Microbiol.* 52(1): 47-58.

**Huang** H, Yanagisawa M, Kisannuki YY, Jelicks LA, Chandra M, Factor MS, Wittner M, Weiss LM, Pestell RG, Shtutin V, Shirani J, Tanowitz HB **(2002)** Role of cardiac myocyte-derived endothelin-1 in chagasic cardiomyopathy: molecular genetic evidence. *Clinical Science* 103(48): 263S-266S.

**Ino** T, Kishiro M, Okubo M, Akimoto K, Nishimoto K, Yabuta K, Okada R. **(1997)** Late persistent expressions of ICAM-1 and VCAM-1 on myocardial tissue in children with lymphocytic myocarditis. *Cardiovasc Res.* 34(2): 323-328.

**Jackson** Y, Alirol E, Getaz L, Wolff H, Combescure C, Chappuis F. **(2010)** Tolerance and Safety of Nifurtimox in Patients with Chronic Chagas Disease. *Clin Infect Dis.* 51(10):e69-e75.

**Keller** TT, Mairuhud A, de Kruif MD, Kleind SK, Gerdes V, ten Cate H, Brandjes D, Levi M, van Gorp E. **(2003)** Infections and endothelial cells. *Cardiovascular Res.* 60: 40-48.

**Lannes-Vieira** J, Silverio JC, Pereira IR, Vinagre NF, Carvalho CM, Paiva CN, Silva da AA. **(2010)** Chronic *Trypanosoma cruzi*-elicited cardiomyopathy: from the discovery to the proposal of rational therapeutic interventions targeting cell adhesion molecules and chemokine receptors - how to make a dream come true. *Mem Inst Oswaldo Cruz.* 1: 226-35.

**Laucella SA, Segura EL, Riarte A, Sosa ES. (1999)** Soluble platelet selectin (sP-selectin) and soluble vascular cell adhesion molecule-1 (sVCAM-1) decrease during therapy with benznidazole in children with indeterminate form of Chagas' disease. *Clin Exp Immunol.* 118(3): 423-427.

**Lauria-Pires I, Braga MS, Vexenat AC, Nitz N, Simoes-Barbosa A, Tinoco DL, Teixeira ARL (2000)** Progressive Chronic Chagas Heart Disease ten years after treatment with anti-*trypanosoma cruzi* nitroderivatives. *Am J Trop Med Hyg.* 63(3, 4): 111–118.

**Libby P, Alroy J, Pereira ME. (1986)** A neuraminidase from *Trypanosoma cruzi* removes sialic acid from the surface of mammalian myocardial and endothelial cells. *J Clin Invest.* 77(1): 127-135.

**Lopes M.F. and DosReis GA. (2000)** Experimental Chagas' disease: phagocytosis of apoptotic lymphocytes deactivates macrophages and fuels parasite growth. *Apoptosis* 5(3): 221-224.

**López-Muñoz R, Faúndes M, Klein S, Escanilla S, Torres G, Lee-Liu D, Ferreira J, Kemmerling U, Orellana M, Morello A, Ferreira A, Maya JD. (2010)** *Trypanosoma cruzi*: In vitro effect of aspirin with nifurtimox and benznidazole. *Exp Parasitol.* 124(2):167-171

**Machado FS, Mukherjee S, Weiss LM, Tanowitz HB, Ashton AW. (2011)** Bioactive lipids in *Trypanosoma cruzi* infection. *Adv Parasitol.* 76:1-31

**Macías C, Villaescusa R, del Valle L, Boffil V, Cordero G, Hernández A, Hernández P, Ballester JM. (2003)** Moléculas de adhesión endoteliales ICAM-1, VCAM-1 y E-selectina en pacientes con síndrome coronario agudo. *Rev Esp Cardiol.* 56(2): 137-44.

**Maier HJ, Schips TG, Wietelmann A, Krüger M, Brunner C, Sauter M, Klingel K, Böttger T, Braun T, Wirth T. (2012)** Cardiomyocyte-specific I $\kappa$ B kinase (IKK)/NF- $\kappa$ B activation induces reversible inflammatory cardiomyopathy and heart failure. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 109(29): 11794-11799.

**Manarin R, Pascutti MF, Ruffino JP, 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(15):2485-91

**Matta Guedes PM, Gutierrez FR, Nascimento MS, Do-Valle-Matta MA, Silva JS. (2012)** Antiparasitological chemotherapy in Chagas' disease cardiomyopathy: current evidence. *Trop Med Int Health.* (In press) doi: 10.1111/j.1365-3156.2012.03025.x.

**Maya** JD, Cassels BK, 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(4): 601-620.

**Maya** JD, Repetto Y, Agosín M, Ojeda JM, Tellez R, Gaule C, Morello A. **(1997)** Effects of nifurtimox and benznidazole upon glutathione and trypanothione content in epimastigote, trypomastigote and amastigote forms of *Trypanosoma cruzi*. *Mol Biochem Parasitol.* 86(1): 101-106.

**Mejia** AM, Hall BS, Taylor MC, Gómez-Palacio A, Wilkinson SR, Triana-Chávez O, Kelly JM. **(2012)** Benznidazole-resistance in *Trypanosoma cruzi* is a readily acquired trait that can arise independently in a single population. *J Infect Dis.* 206(2): 220-8

**Melotti** P, Nicolis E, Tamanini A, Rolfini R, Pavirani A, Cabrini G. **(2001)** Activation of NF- $\kappa$ B mediates ICAM-1 induction in respiratory cells exposed to an adenovirus-derived vector. *Gene Ther.* 8(18):1436-42.

**Michelin**, M.A., Silva, J.S., Cunha, F.Q. **(2005)** Inducible cyclooxygenase released prostaglandin mediates immunosuppression in acute phase of experimental *Trypanosoma cruzi* infection. *Exp Parasitol.* 111: 71-79.

**MINSAL.** **(2011)** Circular de vigilancia de Enfermedad de Chagas (CIE 10: B57, P00.2 y Z22.8) Ministerio de Salud de Chile.

**Monamaris** MB, Kloetzel JK, Andrade HF Jr, Tadokoro CE, Pinge-Filho P & Abrahamsohn IA **(1998)** Prostaglandin and nitric oxide regulate TNF- $\alpha$  production during *Trypanosoma cruzi* infection. *Immunol Lett* 63(1): 1-8.

**Mukherjee** S, Machado FS, Huang H, Oz HS, Jelicks LA, Prado CM, Koba W, Fine EJ, Zhao D, Factor SM, Collado JE, Weiss LM, Tanowitz HB, Ashton AW. **(2011)** Aspirin treatment of mice infected with *Trypanosoma cruzi* and implications for the pathogenesis of Chagas disease. *PLoS One.* 6(2):e16959.

**Muñoz-Saravia** A, Haberland A, Wallukat G, Schimke I. **(2012)** Chronic Chagas' heart disease: a disease on its way to becoming a worldwide health problem: epidemiology, etiopathology, treatment, pathogenesis and laboratory medicine. *Heart Fail Rev.* 17: 45-64.

**Nakahata** N. **(2008)** Thromboxane A<sub>2</sub>: physiology/pathophysiology, cellular signal transduction and pharmacology. *Pharmacol Ther.* 118(1): 18-35.

- Paiva** CN, Arras RH, Lessa LP, Gibaldi D, Alves L, Metz CN, Gazzinelli R, Pyrrho AS, Lannes-Vieira J, Bozza MT. (2007) Unraveling the lethal synergism between *Trypanosoma cruzi* infection and LPS: a role for increased macrophage reactivity. *Eur J Immunol.* 37(5):1355-64.
- Patrono** C, García Rodríguez LA, Landolfi R, Baigent C. (2005) Low-dose aspirin for the prevention of atherothrombosis. *N Engl J Med.* 353(22): 2373-2383.
- Peters** K, Unger RE, Brunner J, Kirkpatrick CJ. (2003) Molecular basis of endothelial dysfunction in sepsis. *Cardiovascular Res.* 60: 49-57.
- Piaggio** E, Sancéau 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-kappaB activation. *J Immunol.* 167(6):3422-6
- Pinazo** MJ, Muñoz J, Posada E, López-Chejade P, Gallego M, Ayala E, del Cacho E, Soy D, Gascon J. (2010) Tolerance of Benznidazole in Treatment of Chagas' Disease in Adults. *Antimicrob Agents Chemoter.* 54(11):4896-4899.
- Pinge-Filho** P, Tadokoro CE & Abrahamsohn IA (1999) Prostaglandins-mediated suppression of lymphoproliferation and cytokine synthesis during the early phase of *Trypanosoma cruzi* infection. *Cell Immunol.* 193: 90-98.
- Prado** CM, Jelicks LA, Weiss LM, Factor SM, Tanowitz HB, Rossi MA. (2011) The Vasculature in Chagas Disease. *Adv Parasitol.* 76: 83-99.
- Punukollu** G, Gowda RM, Khan IA, Navarro VS, Vasavada BC. (2007) Clinical aspects of the Chagas' heart disease. *Int J Cardiol.* 115(3): 279-283.
- Rassi** A Jr, Rassi A, Marcondes de Rezende J. (2012) American Trypanosomiasis (Chagas Disease). *Infect Dis Clin N Am.* 26: 275–291.
- Rassi** A Jr, Rassi A, Marin-Neto JA. (2010) Chagas disease. *Lancet.* 375: 1388-1402.
- Ribeiro** AL, Nunes MP, Teixeira MM, Rocha M. (2012) Diagnosis and management of Chagas disease and cardiomyopathy. *Nat Rev Cardiol.* Advance online publication 31 July 2012; doi:10.1038/nrcardio.2012.109
- Rocha** DB, dos Reis MA, Romano A, de Lima Pereira S, Antunes V, Tostes Jr S, Rodrigues Jr V (2012) In Situ Expression of Regulatory Cytokines by Heart Inflammatory Cells in Chagas' Disease Patients with Heart Failure. *Clin Dev Immunol.* Advance Online Publication doi:10.1155/2012/361730.

**Ronco** MT, Manarin R, Francés D, Serra E, Revelli S, Carnovale C. (2011) Benznidazole treatment attenuates liver NF- $\kappa$ B activity and MAPK in a cecal ligation and puncture model of sepsis. *Mol Immunol.* 48(6-7): 867-873.

**Rossi** MA, Ramos SG. (1996) Coronary microvascular abnormalities in Chagas' disease. *Am Heart J.* 132(1 Pt 1): 207-210.

**Rossi** MA, Tanowitz HB, Malvestio LM, Celes MR, Campos EC, Blefari V, Prado C. (2010) Coronary Microvascular Disease in Chronic Chagas Cardiomyopathy Including an Overview on History, Pathology, and Other Proposed Pathogenic Mechanisms. *PLOS Negl Trop Dis.* 4(8):e674

**Schmunis** GA. (2007) Epidemiology of Chagas' disease in non-endemic countries: the role of international migration. *Mem Inst Oswaldo Cruz.* 102 Suppl 1: 75-85.

**Seeley** EJ, Matthay MA, Wolters PJ. (2012) Inflection Points in Sepsis Biology: From Local Defense to Systemic Organ Injury. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* (In Press) doi:10.1152/ajplung.00069.2012

**Silva** JS, Machado FS, Martins GA. (2003) The role of nitric oxide in the pathogenesis of Chagas' disease. *Front Biosci.* 8: s314-325.

**Soares** MB, Silva-Mota KN, Lima RS, Bellintani MC, Pontes-de-Carvalho L, Ribeiro-dos-Santos R. (2001) Modulation of chagasic cardiomyopathy by interleukin-4: dissociation between inflammation and tissue parasitism. *Am J Pathol.* 159(2): 703-709.

**Soares** MB, de Lima RS, Rocha LL, Vasconcelos JF, Rogatto SR, dos Santos RR, Iacobas S, Goldenberg RC, Iacobas DA, Tanowitz HB, de Carvalho AC, Spray DC. (2010) Gene expression changes associated with myocarditis and fibrosis in hearts of mice with chronic chagasic cardiomyopathy. *J Infect Dis.* 202(3): 416-426.

**Tanowitz** HB, Burns ER, Sinha AK, Kahn NN, Morris SA, Factor SM, Hatcher VB, Bilezikian JP, Baum SG, Wittner M. (1990) Enhanced platelet adherence and aggregation in Chagas' disease: a potential pathogenic mechanism for cardiomyopathy. *Am J Trop Med Hyg.* 43(3): 274-281.

**Tanowitz** HB, Mukhopadhyay A, Ashton AW, Lisanti MP, Machado FS, Weiss LM, Mukherjee S. (2011) Microarray analysis of the mammalian thromboxane receptor-Trypanosoma cruzi interaction. *Cell Cycle.* 10(7): 1132-43.

**Teixeira A**, Hecht MM, Guimaro MC, Sousa AO, Nitz N **(2011)** Pathogenesis of Chagas' Disease: Parasite Persistence and Autoimmunity. *Clin Microbiol Rev.* 24(3): 592-630.

**Tostes S Jr**, Bertulucci Rocha-Rodrigues D, de Araujo Pereira G, Rodrigues V Jr. **(2005)** Myocardocyte apoptosis in heart failure in chronic Chagas' disease. *Int J Cardiol.* 99(2): 233-237.

**Une C**, Andersson J, Orn A. **(2003)** Role of IFN-alpha/beta and IL-12 in the activation of natural killer cells and interferon-gamma production during experimental infection with *Trypanosoma cruzi*. *Clin Exp Immunol.* 134(2): 195-201.

**Urbina JA.** **(2010)** Specific chemotherapy of Chagas disease: Relevance, current limitations and new approaches. *Acta Tropica.* 115:55-68.

**Vilas L**, Bestetti B, Otaviano AP, Cardinalli-Neto A, Nogueira PR. **(2012)** Outcome of Chagas cardiomyopathy in comparison to ischemic cardiomyopathy. *Int J Cardiol.* Advance Online Publication February 2012 doi:10.1016/j.ijcard.2012.01.033

**Viotti R**, Vigliano C, Lococo B, Alvarez MG, 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(2): 157-163.

**Viotti R**, Vigliano C, Lococo B, Bertocchi G, Petti M, Alvarez MG, 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(10): 724-734.

**Waghabi MC**, de Souza EM, de Oliveira GM, Keramidias M, Feige J, Araújo-Jorge TC, Bailly S. **(2009)** Pharmacological Inhibition of Transforming Growth Factor  $\beta$  Signaling Decreases Infection and Prevents Heart Damage in Acute Chagas' Disease. *Antimicrob Agents Chemother.* 53(11): 4694-4701.

**WHO.** **(2005/2007)** Reporte del grupo de trabajo científico sobre la enfermedad de Chagas : 17-20 de abril de 2005, actualizado en julio de 2007, Buenos Aires, Argentina. World Health Organization. Geneva.

**WHO.** **(2010)** Chagas disease: Control and elimination. Report by the Secretariat: A63/17. World Health Organization. Geneva.

**WHO.** **(2012)** Chagas Disease Fact Sheet n° 340. World Health Organization. Geneva.

**Wu** KK and **Thiagarajan** P. (1996) Role of endothelium in thrombosis and hemostasis. *Annu Rev Med.* 47: 315-331.

**Xue** J, Thippgowda PB, Hu G, Bachmaier K, Christman JW, Malik AB, Tirupathi C. (2009) NF-kappaB regulates thrombin-induced ICAM-1 gene expression in cooperation with NFAT by binding to the intronic NF-kappaB site in the ICAM-1 gene. *Physiol Genomics.* 38(1):42-53.

**Yacoub** S, Mocumbi AO, Yacoub MH. (2008) Neglected tropical cardiomyopathies: I. Chagas' disease: myocardial disease. *Heart.* 94(2): 244-248.