

UNIVERSIDAD DE CHILE
FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS Y FARMACÉUTICAS



**Resolvina D1 gatillada por aspirina limita el progreso de la
Cardiomiopatía Chagásica Crónica, regulando la expresión de TNF α e
IL-10 en tejido cardiaco**

Tesis presentada a la Universidad de Chile para optar al grado de Doctor en
Farmacología por:

ILEANA VANESSA V. CARRILLO WERNER

DIRECTORES DE TESIS:

DR. JUAN DIEGO MAYA ARANGO

DR. GUILLERMO DÍAZ ARAYA

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

Santiago, Chile
Junio 2022

UNIVERSIDAD DE CHILE

FACULTAD DE CIENCIAS QUIMICAS Y FARMACEUTICAS

INFORME DE APROBACIÓN DE TESIS DE DOCTORADO

Se informa a la Dirección de la Escuela de Graduados de la Facultad de Ciencias Químicas y Farmacéuticas que la Tesis de Doctorado presentada por el candidato

ILEANA VANESSA V. CARRILLO WERNER

Ha sido aprobada por la Comisión de Evaluadora de Tesis como requisito para optar al grado de Doctor en Farmacología, en el examen público rendido el día:

Directores de tesis:

Dr. Juan Diego Maya



Dr. Guillermo Díaz Araya



Comisión evaluadora de tesis:

Dr. Ramón Rodrigo

Dra. Valentina Parra

Dra. Caroll Beltrán

Dra. María Angélica Hidalgo

AGRADECIMIENTOS

En primer lugar, agradezco a mi familia, mi esposo y mi hijo por siempre estar ahí para mí, por ser la fuerza que me impulsa a continuar y retomar el rumbo hacia mis objetivos día tras día.

En segundo lugar, agradezco a los directores de Tesis, los profesores Juan Diego Maya y Guillermo Diaz, por orientarme y ayudarme a obtener la mejor versión de este trabajo. A la comisión evaluadora, por su destacable disposición y colaboración.

En tercer lugar, pero con un inmenso cariño, agradezco a todos mis compañeros del laboratorio, en especial a Fabiola, Daniela, Helena y Sebastián, por la motivación, la compañía y el apoyo. Agradezco a todos los que son parte del laboratorio del Programa de Farmacología Molecular y Clínica, por los gratos momentos y aprendizajes. Una mención especial a la Profesora Jenny Fiedler y a mi compañero de doctorado Felipe Aguayo, por la confianza, por el apoyo y acompañarme durante todo el doctorado.

No puedo dejar de agradecer a la Dra. Fabiana Machado y su equipo de laboratorio, en especial a Rayane Rabelo, que me recibieron con los brazos abiertos en Belo Horizonte, Brasil, e hicieron que tuviera una experiencia increíble, llena de desafíos, aprendizaje y lindos recuerdos.

Por último, a mí, por continuar y seguir adelante.

FINANCIAMIENTO

La presente Memoria contó con el apoyo financiero de la agencia Nacional de Investigación y Desarrollo (ANID) FONDECYT Regular N° 1210359 (JDM), N° 1210627 y ANID Beca N° 21170501, en conjunto con, el “Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico” (CNPq: 305894/2018-8 FSM), la “Fundação de Amparo a Pesquisa de Minas Gerais” (FAPEMIG: Rede Mineira de Imunobiológicos; REDE-00140-16 FSM), y el “Instituto Nacional para la Ciencia y Tecnología en Dengue e Interacciones hospedero-microorganismo” (APQ-03606-17 FSM).

El desarrollo experimental del presente trabajo se realizó en el Instituto de Ciencias Biológicas de la Universidad Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, Brasil. El procesamiento de las muestras y el análisis de datos se realizó en el Instituto de Ciencias Biomédicas, Programa de Farmacología Molecular y Clínica, Facultad de Medicina, Universidad de Chile, Santiago, Chile.

ÍNDICE GENERAL

ABREVIATURAS.....	11
RESUMEN.....	12
SUMMARY	13
1. INTRODUCCIÓN	14
1.1 ENFERMERDAD DE CHAGAS.....	14
1.1.1 ASPECTOS GENERALES DE LA ENFERMEDAD DE CHAGAS	14
1.1.2 EPIDEMIOLOGÍA	14
1.1.3 MANIFESTACIONES CLÍNICAS DE LA EC.....	15
1.1.4 CARDIOMIOPATÍA CHAGÁSICA CRÓNICA	15
1.1.5 DIAGNÓSTICO.....	16
1.1.6 TRATAMIENTO FARMACOLÓGICO ACTUAL DE LA EC.....	17
1.2 ROL DE LA INFLAMACIÓN EN LA PATOGÉNESIS DE LA CCC.....	19
1.3 RESOLUCIÓN DE LA INFLAMACIÓN.	21
1.3.1 BIOSÍNTESIS DE SPM.....	23
1.3.2 RECEPTORES DE SPM.....	26
1.3.3 RECEPTOR DE LIPOXINA A4 O RECEPTOR FORMILPEPTIDO 2 (ALX/FPR2)	26
1.3.4 RESOLVINA D1 GATILLADA POR ASPIRINA (AT-RVD1).....	28
1.3.5 MECANISMO DE ACCIÓN DE RVD1 Y AT-RVD1.....	29
1.3.6 AT-RVD1 COMO TERAPIA DE LA EC	31
2. HIPÓTESIS.....	33
3. OBJETIVOS.....	34
3.1 OBJETIVO GENERAL.....	34
3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	34
4. MATERIALES Y MÉTODOS	35
4.1 ANIMALES.....	35
4.2 OBTENCIÓN DE PARASITOS E INFECCIÓN CON <i>T. cruzi</i>	35
4.3 TRATAMIENTOS	36
4.4 ELISA	36

4.5	TRANSCRIPCIÓN INVERSA Y REACCIÓN EN CADENA DE LA POLIMERASA CUANTITATIVA (RT-qPCR).....	37
4.6	CARGA PARASITARIA	38
4.7	HISTOLOGÍA	39
4.8	INMUNOFLUORESCENCIA.....	40
4.8.1	Inmunotinción p65	40
4.8.2	Inmunotinción CD4 ⁺ IFN γ ⁺	40
4.9	ELECTROCARDIOGRAMA (ECG).....	41
4.10	ANÁLISIS ESTADÍSTICO.....	42
5.	RESULTADOS	43
5.1	VALIDACIÓN DEL MODELO MURINO DE EC CRÓNICA.	43
5.2	EFFECTO DE AT-RVD1 SOBRE LA RESPUESTA INMUNE EN EL MODELO MURINO DE EC CRÓNICA.	46
5.2.1	AT-RvD1 reduce los niveles séricos de IFN γ e IL-1 β en ratones C57BL/6 infectados con <i>T. cruzi</i> , en una acción mediada por FPR2.	46
5.2.2	AT-RvD1 contrarresta el ambiente proinflamatorio a nivel cardíaco, reduce la expresión de IL-1 β y TNF α e incrementa la expresión de IL-10.....	47
5.2.3	AT-RvD1 reduce la translocalización nuclear de p65 en el tejido cardíaco de ratones C57BL/6 crónicamente infectados con <i>T. cruzi</i> , por acción sobre FPR2.	51
5.3	EL TRATAMIENTO CON AT-RVD1, MEDIANTE EL RECEPTOR FPR2, REDUCE EL INFILTRADO INFLAMATORIO, HIPERTROFIA Y FIBROSIS DEL TEJIDO CARDÍACO, EN EL MODELO MURINO DE CCC.	53
5.3.1	AT-RvD1 reduce el infiltrado inflamatorio en el tejido cardíaco de los ratones infectados con <i>T. cruzi</i> , mediante el receptor FPR2.	53
5.3.2	AT-RvD1 previene la hipertrofia cardíaca en el modelo murino de CCC.....	56
5.3.3	AT-RvD1 previene la fibrosis cardíaca en el modelo murino de CCC.	59
5.4	DETERMINACIÓN DEL EFECTO DE AT-RVD1 SOBRE LA ACTIVIDAD ELÉCTRICA CARDÍACA EN RATONES INFECTADOS CON <i>T. cruzi</i>	62
5.4.1	Alteraciones electrocardiográficas en ratones C57BL/6 WT y FPR2 ^{-/-} infectados con <i>T. cruzi</i>	62

5.4.2	AT-RvD1, y en mayor grado benznidazol, previenen las alteraciones electrocardiográficas en el modelo murino de EC crónica.	65
5.4.3	Efecto de AT-RvD1 sobre la carga parasitaria en el corazón de ratones C57BL/6 WT y FPR2 ^{-/-} infectados con <i>T. cruzi</i>	66
6.	DISCUSION	68
6.1	Consecuencias de la ausencia del receptor FPR2 durante la infección con <i>T. cruzi</i>	68
6.2	AT-RvD1 disminuye el proceso inflamatorio en la EC crónica temprana.	70
6.3	AT-RvD1 reduce la carga parasitaria cardiaca en ratones infectados por <i>T. cruzi</i>	75
7.	CONCLUSION	77
8.	REFERENCIAS	79
9.	PUBLICACIONES DERIVADAS DE LA TESIS	98
9.1	ARTÍCULOS	98
9.2	PRESENTACIONES A CONGRESOS INTERNACIONALES	98
9.3	PRESENTACIONES A CONGRESOS NACIONALES	99

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Esquema de la respuesta inflamatoria aguda y su resolución en el tiempo	22
Figura 2. Esquema de las rutas biosintéticas de SPM y epímeros gatillados por aspirina.....	25
Figura 3. Esquema resumen de los mecanismos de acción descritos hasta la fecha para RvD1. 31	
Figura 4. Esquema de infección y tratamiento del modelo experimental utilizado	36
Figura 5. Trazado electrocardiográfico y ecuación de Bazzet.	41
Figura 6. Parasitemia y supervivencia en ratones C57BL/6 Wild-type (WT) o knockout para FPR2 (FPR2 ^{-/-}) infectados con <i>T. cruzi</i> (Dm28c).....	43
Figura 7. Niveles de citoquinas en ratones infectados con <i>T. cruzi</i> a 20, 40 y 60 d.p.i.	45
Figura 8. Niveles séricos de citoquinas en ratones infectados con <i>T. cruzi</i> y tratados con AT-RvD1 o benznidazol (Bz) (60 d.p.i).....	47
Figura 9. Niveles de RNA mensajero de citoquinas en tejido cardíaco de ratones infectados con <i>T. cruzi</i> y tratados con AT-RvD1 o benznidazol (Bz) (60 d.p.i).....	48
Figura 10. AT-RvD1 reduce la presencia de células CD4 ⁺ productoras de IFN γ en los infiltrados celulares del tejido cardíaco de ratones infectados crónicamente con <i>T. cruzi</i>	51
Figura 11. Localización nuclear de p65 en tejido cardíaco de ratones infectados con <i>T. cruzi</i> (60 d.p.i) y tratados con AT-RvD1 o benznidazol (Bz) por 20 días.....	53
Figura 12. AT-RvD1 reduce el infiltrado celular en el tejido cardíaco de ratones C57BL/6 infectados crónicamente con <i>T. cruzi</i>	56
Figura 13. AT-RvD1 reduce la hipertrofia cardíaca en C57BL/6 infectados crónicamente con <i>T. cruzi</i>	59
Figura 14. AT-RvD1 reduce la fibrosis cardíaca en ratones C57BL/6 infectados crónicamente con <i>T. cruzi</i>	62
Figura 15. Cambios electrocardiográficos a los 25, 40 y 60 días postinfección en ratones C57BL/6 WT y FPR2 ^{-/-} infectados con <i>T. cruzi</i> (cepa Dm28c).....	64
Figura 16. Efecto de AT-RvD1 y benznidazol (Bz) en ratones C57BL/6 WT y FPR2 ^{-/-} infectados con <i>T. cruzi</i> sobre el sistema de conducción eléctrica cardíaca.....	66
Figura 17. Carga de parásitos en tejido cardíaco de ratones infectados crónicamente con <i>T. cruzi</i> y tratados con AT-RvD1 o benznidazol (Bz) a los 60 d.p.i.	67
Figura 18. Esquema resumen de los efectos y posibles mecanismos de acción de AT-RvD1.....	78

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Partidores utilizados en los ensayos de RT-qPCR.....	38
--	----

ABREVIATURAS

AA	Ácido araquidónico
ANP	Péptido natriurético atrial
ASA	Ácido acetilsalicílico
AT-RvD1	Resolvina D1 gatillada por Aspirina
BNP	Péptido natriurético cerebral
Bz	Benznidazol
CCC	Cardiomiopatía chagásica crónica
d.p.i	Días postinfección
DHA	Ácido docosahexaenóico
EC	Enfermedad de Chagas
FPR2/ALX	Receptor Formil-peptido 2 / Receptor de Lipoxina A ₄
IFNγ	Interferon gamma
IL-10	Interleuquina 10
IL-1β	Interleuquina 1 beta
LOX	Lipoxigenasas
Lx	Lipoxina
LXA₄	Lipoxina A ₄
NFκB	Factor nuclear κ B
p.i	Postinfección
Rv	Resolvina
SPMs	Mediadores proresolutorios especializados
<i>T. cruzi</i>	<i>Trypanosoma cruzi</i>
Th1	T helper 1
TNFα	Factor de Necrosis Tumoral alfa
α-SMA	Alfa actina de músculo liso

RESUMEN

La enfermedad de Chagas, causada por el protozoario *Trypanosoma cruzi*, es endémica en América Latina y está ampliamente distribuida en todo el mundo debido a la migración poblacional. Clínicamente, se caracteriza por una fase aguda generalmente asintomática y que, en ausencia de tratamiento, avanza a una fase crónica. Cuando la enfermedad progresa, hasta un 30% de las personas infectadas, desarrollan manifestaciones clínicas, siendo la miocardiopatía inflamatoria progresiva crónica, la más frecuente, que causa insuficiencia cardíaca y muerte. Debido a la persistencia del parásito y a la falta de un equilibrio adecuado en la respuesta inflamatoria, se establece una inflamación crónica que se ha relacionado con la progresión de la cardiomiopatía. Actualmente, las estrategias terapéuticas disponibles son incapaces de prevenir o revertir el daño cardíaco producido por el parásito. Frente a este escenario, promover la resolución de la inflamación es una potencial estrategia terapéutica. La resolvina D1 gatillada por aspirina (AT-RvD1) es un mediador proresolutorio de la inflamación recientemente descrito. Éste, participa en la regulación de la producción de citoquinas proinflamatorias, la inhibición del reclutamiento de leucocitos, la eferocitosis de los macrófagos, promoviendo así, la homeostasis de los tejidos y restaurando la función de los órganos. En base a estas propiedades, en el presente estudio se propone a AT-RvD1 como estrategia terapéutica para regular el estado proinflamatorio durante la fase crónica de la Enfermedad de Chagas. Para ello, ratones C57BL/6 silvestres y transgénicos *knock-out* para el receptor de AT-RvD1, FPR2/ALX, fueron infectados con *T. cruzi*, y al cabo de 40 días postinfección, fueron tratados con 5 µg/Kg/día de AT-RvD1 o 30 mg/Kg/día de benznidazol, durante 20 días. Al final del tratamiento, se evaluaron los cambios en la respuesta inmune, el daño del tejido cardíaco y la carga parasitaria. Como resultado se obtuvo que, la administración de AT-RvD1 en la fase crónica de la infección por *T. cruzi* regula la respuesta inflamatoria tanto a nivel sistémico como en el tejido cardíaco. Consecuentemente, reduce el infiltrado celular, la hipertrofia, la fibrosis cardíaca, y la carga parasitaria en el corazón. Así, AT-RvD1 puede ser una promisoriosa estrategia terapéutica no solo por el efecto regulador de la respuesta inflamatoria a nivel cardíaco, sino también por favorecer la reducción de la carga parasitaria durante la infección crónica por *T. cruzi*, previniendo la progresión del daño inducido por el parásito.

SUMMARY

Chagas disease, caused by the protozoan *Trypanosoma cruzi*, is endemic in Latin America and widely distributed throughout the world due to population migration. Clinically, it is characterized by a generally asymptomatic acute phase that, in the absence of treatment, progresses to a chronic phase. When the disease progresses, up to 30% of infected people develop clinical manifestations, being the most frequent the chronic progressive inflammatory cardiomyopathy, which causes heart failure and death. Due to the persistence of the parasite and the lack of an adequate balance in the inflammatory response, a chronic inflammation is established that has been related to the progression of cardiomyopathy. Currently, the available therapeutic strategies are unable to prevent, or reverse heart damage caused by the parasite. Faced with this scenario, promoting the resolution of inflammation is a potential therapeutic strategy. Aspirin-triggered resolvin D1 (AT-RvD1) is a recently discovered proresolving mediator of inflammation. This participates in the regulation of the production of proinflammatory cytokines, the inhibition of leukocyte recruitment, the efferocytosis of macrophages, thus promoting tissue homeostasis and restoring organ function. Based on these properties, in the present study an AT-RvD1 is proposed as a therapeutic strategy to regulate the proinflammatory state during the chronic phase of Chagas Disease. For this, C57BL/6 wild and transgenic knock-out mice for the AT-RvD1 receptor, FPR2/ALX, were infected with *T. cruzi*, and after 40 days post-infection, they were treated with 5 µg/Kg/day of AT-RvD1 or 30 mg/Kg/day of benznidazole, for 20 days. At the end of treatment, changes in immune response, cardiac tissue damage, and parasite load were assessed. As a result, it was obtained that the administration of AT-RvD1 in the chronic phase of the *T. cruzi* infection regulates the inflammatory response both at the systemic level and in the cardiac tissue. Consequently, reduce cellular infiltrate, hypertrophy, cardiac fibrosis, and parasitic load in the heart. Thus, AT-RvD1 may be a promising therapeutic strategy not only during the regulatory effect of the inflammatory response at the cardiac level, but also by favoring the reduction of the parasitic load in chronic *T. cruzi* infection, preventing the progression of the damage induced by the parasite.

1. INTRODUCCIÓN

1.1 ENFERMEDAD DE CHAGAS

1.1.1 ASPECTOS GENERALES DE LA ENFERMEDAD DE CHAGAS

La Enfermedad de Chagas (EC) es una enfermedad infecciosa causada por el parásito protozoario hemoflagelado *Trypanosoma cruzi* (*T. cruzi*), el cual es transmitido principalmente por vectores, insectos hematófagos de la subfamilia *Triatominae*, conocidos comúnmente como “vinchucas”. También, se puede transmitir por vía oral mediante la ingesta de alimentos contaminados con el parásito, transfusiones de sangre o trasplantes de órganos proveniente de pacientes infectados, por transmisión congénita de madre a hijo o accidentalmente en laboratorios (Angheben et al., 2015; Mills, 2020).

1.1.2 EPIDEMIOLOGÍA

La EC es endémica en el continente americano desde el sur de Estados Unidos, hasta el sur de Argentina y Chile, incluyendo 21 países (PAHO, 2018). Se estima que entre 6 a 7 millones de personas están actualmente infectadas con *T. cruzi*, y más de 100 millones están en riesgo de contraer la infección (WHO, 2020). En los países endémicos, la transmisión del parásito es principalmente vectorial y predomina en áreas rurales, ya que la infraestructura rudimental provee las condiciones medioambientales necesarias para el desarrollo y reproducción del insecto vector. Sin embargo, en las últimas décadas, se ha globalizado esta enfermedad, debido a la incrementada migración poblacional desde áreas endémicas a países no endémicos, reportándose así casos en: Japón, Canadá, Europa, Australia y el norte de Estados Unidos, donde las vías de transmisión no vectoriales predominan (Lidani et al., 2019; WHO, 2020).

En Chile, los casos se distribuyen entre la Región de Arica y Parinacota y la Región de O’Higgins. A pesar de las intervenciones de control vectorial, que han disminuido notablemente la transmisión del parásito, en el año 2018 la prevalencia de la EC fue de 1.540 casos cada 100.000 habitantes, reflejando la continuidad de la transmisión, situando

a esta enfermedad como una enfermedad desatendida y un problema de salud pública en el país (MINSAL, 2018).

1.1.3 MANIFESTACIONES CLÍNICAS DE LA EC

El curso clínico de la EC se divide en fase aguda y crónica. La fase aguda dura de 4 a 8 semanas y es generalmente asintomática. Solo el 10% de los casos presentan síntomas inespecíficos como fiebre, escalofríos, mialgias, erupción cutánea y taquicardia (Coura & Dias, 2009). En el caso de la transmisión vectorial, en el sitio de entrada del parásito puede presentarse una lesión inflamatoria (chagoma), o característicamente, cuando la lesión es a nivel ocular, un edema periorbitario unilateral, conocido como el Signo de Romaña. Sin embargo, dada la inespecificidad de estos síntomas, la fase aguda usualmente pasa inadvertida y se resuelve espontáneamente, después de la cual, los pacientes se convierten en crónicamente infectados si no son tratados (Pérez-Molina, 2018).

De esta manera, la fase crónica comienza pasadas las 8 semanas, pero se manifiesta décadas después de haber sufrido la infección. Ésta se caracteriza por la seropositividad a *T. cruzi* y parasitemia negativa (Rassi, et al., 2000). Entre el 30-40% de los pacientes crónicamente infectados desarrollan mayormente cardiomiopatía y/o megasíndromes digestivos (megaesófago, megacolon), resultando en complicaciones severas y elevada mortalidad (Lescure et al., 2010; Malik, et al., 2015). Estas manifestaciones clínicas son el resultado de tres procesos patológicos importantes: inflamación, muerte celular y fibrosis, los cuales están estrechamente relacionados y comprometen la mayoría de los órganos de los vertebrados, pero tienen relevancia en el corazón, tubo digestivo y sistema nervioso a consecuencia del tropismo de este parásito por estos tres tejidos (Prata, 2001; Coura, 2007).

1.1.4 CARDIOMIOPATÍA CHAGÁSICA CRÓNICA

La cardiomiopatía chagásica crónica (CCC) es considerada la manifestación clínica más frecuente y severa de la EC, debido a su gravedad, morbilidad y mortalidad (Tanowitz et al., 2015). Se caracteriza por una cardiomiopatía dilatada con fracción de eyección ventricular reducida, con evidente hipertrofia y adelgazamiento de la pared del ventrículo izquierdo, que favorece el desarrollo de un aneurisma apical y la formación de trombos

intramurales (Nunes et al., 2018). Generalmente, se presentan anomalías del sistema de conducción como: bloqueo de la rama derecha, bradicardia sinusal, arritmias, alteración en la conducción auriculoventricular e intraventricular (Tanowitz et al., 2015; Nunes et al., 2018). Adicionalmente, la presencia de extrasístoles ventriculares es también un hallazgo común y de mal pronóstico en los pacientes con CCC (Rassi, et al., 2010).

A nivel histológico, en la CCC se presentan áreas de infiltrado celular focalizados e inflamación, hipertrofia de los cardiomiocitos y fibrosis (Bonney et al., 2019). Todas estas alteraciones en la arquitectura y conducción llevan al desarrollo de una insuficiencia cardíaca y aumentan el riesgo de sufrir eventos tromboembólicos (Echavarría et al., 2021). Algunos biomarcadores como el péptido natriurético tipo B (BNP) y su fragmento N-terminal (Pro-BNP) han sido asociados con diferentes estadios y severidad de la cardiomiopatía (Echeverría et al., 2017; Nunes et al., 2018). La muerte súbita es la principal causa de muerte de pacientes con CCC, que afecta frecuentemente a jóvenes económicamente productivos, resultando una importante pérdida económica (Echavarría et al., 2021).

1.1.5 DIAGNÓSTICO

Durante la fase aguda de la enfermedad, es posible realizar un diagnóstico parasitológico directo mediante la visualización de tripomastigotes (estadio extracelular infectante del parásito) en una muestra de sangre utilizando un microscopio óptico, o por métodos parasitológicos indirectos basados en la técnica Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR), que se destaca por su elevada sensibilidad al detectar e incluso cuantificar secuencias de DNA o RNA específicas del parásito en muestras de sangre. Posteriormente, debido a la escasa e intermitente parasitemia durante la fase crónica, el diagnóstico se basa en pruebas serológicas. No existe un ensayo *gold-standard* para el diagnóstico de la EC. Las pruebas más comunes son ensayo de inmunoabsorción ligado a enzimas (ELISA), ensayo de inmunofluorescencia y hemaglutinación indirecta. Estos emplean antígenos parasitarios o extractos purificados con la finalidad de detectar la presencia de anticuerpos IgG específicos contra *T. cruzi* en suero. La Organización Mundial de la Salud (OMS) recomienda realizar al menos dos ensayos serológicos diferentes en conjunto con la

información epidemiológica del paciente, para confirmar el diagnóstico (Pérez-Molina et al., 2018).

Por lo general, los ensayos de PCR no se usan para diagnosticar la infección en fase crónica, pero guardan cierta utilidad para la detección temprana de reactivación en pacientes inmunocomprometidos, por ejemplo, receptores de trasplantes y en estudios de investigación como criterios de fracaso terapéutico (Nunes et al., 2018).

1.1.6 TRATAMIENTO FARMACOLÓGICO ACTUAL DE LA EC

Actualmente, el tratamiento farmacológico antiparasitario se basa en el uso del benznidazol. Éste, es un profármaco, que tras su activación por la enzima Nitroreductasa (NTR) tipo I ejerce efectos citotóxicos (Wilkinson & Kelly 2009, Wilkinson et al., 2011). Su selectividad antitripanocida se debe a la expresión de la NTR tipo I en el parásito, ya que esta enzima está ausente en eucariontes superiores (Wilkinson & Kelly 2009; Alsford et al., 2012). Esta enzima, cataliza la reducción secuencial de dos electrones del grupo nitro del sustrato para generar un grupo nitroso y posteriormente hidroxilamina (Hall et al., 2011; Hall & Wilkinson 2012). Los metabolitos derivados de esta reacción pueden directamente interactuar y modificar covalentemente macromoléculas en el interior del parásito, como el DNA, resultando en efectos pleiotrópicos dentro de la célula (Trochine et al., 2014), entre los que se destaca, lesiones oxidativas y ruptura de la doble cadena del DNA (Rajao et al., 2014; Campos et al., 2014). Existen otras enzimas oxidorreductasas que podrían participar en la activación del benznidazol, son denominadas NTR tipo II, las cuales, son sensibles al oxígeno y catalizan la reducción de un electrón para formar un anión nitro, el cual puede en condiciones aeróbicas, ser reoxidado a su compuesto nitro original, generando especies reactivas de oxígeno como anión superóxido, induciendo estrés oxidativo. Sin embargo, este último mecanismo no se ha comprobado con el benznidazol, ya que la adición del profármaco al extracto tripanosomal no gatilla la producción significativa de especies reactivas de oxígeno (Viodé et al., 1999). Además, otra enzima del parásito “Old Yellow Enzyme”, presenta características de ambas NTR tipo I y tipo II, por lo que también se ha sugerido que podría metabolizar el profármaco (Díaz-Viraque et al., 2018). Hasta el momento, se conoce que el benznidazol promueve la oxidación de nucleótidos (Rajao et al., 2014), y esto, conlleva a alteraciones en el

emparejamiento de bases, a la formación de mutaciones puntuales y/o generación de ruptura de DNA de doble cadena (Rajao et al., 2014; Dattani et al., 2021).

Benznidazol ha demostrado ser efectivo en la fase aguda, reduciendo la severidad de los síntomas y la agresividad de la enfermedad (Apt W. et al., 2010) Sin embargo, puede causar toxicidad sistémica y reacciones adversas importantes que incluyen hipersensibilidad (rash cutáneo, fiebre, edema generalizado), polineuropatías periféricas, leucopenia, trombocitopenia y mutagénesis en terapias a largo plazo, que obligan a suspender el tratamiento (Prata et al., 2001).

Recientemente se publicó un estudio clínico llamado BENEFIT, cuya finalidad fue evaluar la eficacia y seguridad del benznidazol en pacientes con CCC establecida. Después de un seguimiento de 6 años post-tratamiento, se concluyó que, benznidazol no reduce significativamente la progresión clínica a pesar de negativizar la carga parasitaria, ya que los pacientes tratados con benznidazol, presentaron eventos cardiovasculares como: taquicardia ventricular sostenida, accidente cerebrovascular, eventos tromboembólicos, requirieron la inserción de marcapasos o trasplante cardíaco, entre otros eventos, incluso la muerte (Morillo et al., 2015). *Esto pone en evidencia la importancia de estudiar fármacos que mejoren la actividad de benznidazol o reviertan el daño cardíaco producido por el parásito.*

Adicionalmente, la terapia farmacológica de la CCC va en concordancia con las recomendaciones clínicas para el manejo de la falla cardíaca. A pesar de que estos tratamientos cuentan con evidencia basada en estudios clínicos, éstos no se enfocan directamente en la falla cardíaca derivada de CCC. El tratamiento de primera línea para las cardiopatías son los inhibidores de la enzima convertidora de angiotensina (IECA) y los β bloqueadores (Marti Carvajal & Kwong, 2016). En casos con insuficiencia cardiaca avanzada, el tratamiento de elección es el trasplante, sin embargo, esto no es siempre factible en los pacientes con CCC, debido a que la terapia de inmunosupresión puede reactivar la infección por *T. cruzi* (Moreira & Renan, 2020).

En este contexto, a pesar de la extensa investigación en el área, no se han descubierto nuevos agentes antichagásicos con eficacia superior a la convencional, ni se ha avanzado

en el desarrollo de vacunas; esto, en conjunto con la ausencia de tratamientos que puedan revertir el daño cardíaco producido, *destacan la necesidad de nuevas estrategias que limiten el progreso de la CCC y mejoren la calidad de vida de los pacientes.*

1.2 ROL DE LA INFLAMACIÓN EN LA PATOGÉNESIS DE LA CCC

La patogénesis de la EC crónica es compleja y no se comprende en totalidad. Sin embargo, a partir de la evidencia en animales y seres humanos, se ha propuesto que la CCC es resultado del daño producido por la persistencia del parásito y el daño mediado por la respuesta inmunológica del hospedero (Teixeira et al., 2011), y de manera secundaria, por disautonomía cardíaca y alteraciones microvasculares, donde la inflamación crónica es la mayor determinante de la progresión de la cardiomiopatía (Marin-Neto et al., 2007; Bonney et al., 2019).

A raíz de la primoinfección e impulsado por el tropismo del parásito, a nivel cardíaco se produce un infiltrado inflamatorio conformado principalmente por polimorfonucleares (PMN) y mononucleares, los cuales, a través de la producción de citoquinas como IFN γ , TNF α , IL-12, IL-18, producen una respuesta inflamatoria inicial intensa (Esper et al., 2015). Además, participan otros mediadores inflamatorios como quimioquinas, moléculas de adhesión celular y vascular que favorecen la migración de leucocitos y amplifican la respuesta (Esper et al., 2015; Acevedo et al., 2018).

Seguidamente, se desarrolla una respuesta inmune adaptativa antígeno específica de tipo *T helper 1* (Th1), la cual, se caracteriza por la producción de IFN γ , IL-2, IL-12 y TNF α . En este contexto, se promueve la diferenciación y proliferación de células T CD4⁺ y CD8⁺ antígeno específicas necesarias para la eliminación de células infectadas. La respuesta de tipo Th1 está dirigida al control del parásito, pero también está relacionada con la inflamación exacerbada y sostenida que aumenta la severidad de las lesiones cardíacas (Flávia et al., 2015).

No obstante, la respuesta desencadenada no es lo suficientemente eficaz para lograr la eliminación completa del parásito. *T. cruzi*, es capaz de sobrevivir dentro de las células del hospedero mamífero gracias a su gran repertorio de mecanismos de evasión del sistema

inmunológico, sin afectar críticamente al hospedero (Flávia et al., 2015; Reyes & Rosales, 2019). Así, finalizada esta fase, el sistema inmune logra contener en gran medida al parásito, pero no definitivamente. La persistencia del parásito a nivel tisular mantiene una activación del sistema inmune de manera sostenida, produciendo una inflamación crónica, lo que conduce al desarrollo y progreso de la CCC (Teixeira et al., 2011; Machado et al., 2012; Pérez-Mazliah et al., 2021).

El establecimiento de un medioambiente inflamatorio en el tejido cardíaco, rico en citoquinas proinflamatorias, se ha correlacionado a la severidad de la CCC (Reis et al., 1993; Abel et al., 2001). La razón por la cual algunas personas infectadas permanecen en la fase asintomática sin desarrollar manifestaciones clínicas, mientras otros progresan a cardiopatías permanece sin esclarecerse. Evidencias demuestran que células mononucleares de sangre periférica, provenientes de pacientes con CCC, producen más citoquinas proinflamatorias ($IFN\gamma$, $TNF\alpha$, $IL-1\beta$ e $IL-6$) y menos antiinflamatorias ($IL-10$) que las células mononucleares de pacientes con EC asintomática. Inversamente, los pacientes en fase indeterminada presentan una mayor producción de citoquinas antiinflamatorias como $IL-10$ sobre las proinflamatorias, antes citadas, logrando un equilibrio entre el parásito y el hospedero (de Araújo et al., 2012; Sousa et al., 2014). Estos antecedentes han permitido sugerir que el desbalance en la respuesta inmunológica conlleva al deterioro del tejido cardíaco y su función. Por lo tanto, *la modulación de la respuesta inflamatoria es un potencial blanco terapéutico para la CCC.*

Las citoquinas tienen un rol clave en la respuesta inmune y en el control de la infección, pero también pueden modular la función cardíaca. $TNF\alpha$ puede generar efectos deletéreos en el tejido cardíaco, disminuyendo la capacidad contráctil, por alterar la expresión de proteínas que conforman la maquinaria contráctil de los cardiomiocitos (Cruz et al., 2016). En este sentido, se ha asociado claramente al $TNF\alpha$ con la patogénesis de enfermedades cardiovasculares y falla cardíaca crónica (Kubota et al., 1997). Además, en pacientes con CCC los elevados niveles plasmáticos de $TNF\alpha$ se correlacionan directamente con una disfunción cardíaca, por presentar una reducida fracción de eyección ventricular y disfunción diastólica del ventrículo izquierdo (Ferreira et al., 2003; Sousa et al., 2014).

La producción de IFN γ es parte fundamental de la respuesta inmune frente a *T. cruzi*. Principalmente activa a macrófagos para producir TNF α entre otras citoquinas y quimioquinas, que atraen mayor número de células Th1 e intensifican la respuesta (Acevedo et al., 2018). Además, promueve niveles incrementados de especies reactivas de oxígeno y de nitrógeno que tienen un rol importante en el control del parásito. Sin embargo, la producción sostenida promueve un estrés oxidativo y nitrosativo que induce la disfunción mitocondrial, deterioran la producción de energía y la función contráctil (Nunes et al., 2021). Además, promueve la fibrosis cardíaca aumentando la proliferación de fibroblastos, la producción de metaloproteinasas 2 y 9 (Acevedo et al., 2018). La producción de IFN γ de manera exacerbada y sostenida se ha relacionado ampliamente con insuficiencia cardíaca crónica (Reifenberg et al., 2007).

De esta forma, los linfocitos Th1 son necesarios para controlar el parásito, sin embargo, la perpetuación de la respuesta inducida por *T. cruzi*, permite el establecimiento de inflamación crónica conducente a la insuficiencia cardíaca. *Es por esto que, la evaluación de nuevos fármacos que promuevan un estado antiinflamatorio es esencial para prevenir el deterioro cardíaco.*

1.3 RESOLUCIÓN DE LA INFLAMACIÓN.

En la inflamación se producen mediadores proinflamatorios como prostaglandinas, leucotrienos, citoquinas y quimioquinas, que coordinan el reclutamiento de leucocitos. Una vez que el origen del proceso inflamatorio ha sido controlado, se recupera la homeostasis y la función normal de los tejidos gracias al proceso resolutivo de la inflamación (Serhan, 2014; Basil & Levy 2016).

La resolución de la inflamación es un proceso activo que involucra la biosíntesis de mediadores proresolutorios especializados (SPMs; del inglés *Specialized Pro-resolving Mediators*) como lipoxinas (Lxs), resolvinas (Rvs), protectinas y maresinas. La acción conjunta de estas moléculas detiene el reclutamiento de leucocitos hacia el sitio de la inflamación, inhibe la biosíntesis de mediadores proinflamatorios lipídicos (prostaglandinas y leucotrienos), modifica la producción de citoquinas de un perfil proinflamatorio hacia uno antiinflamatorio, conduce a la apoptosis de los PMN, promueve la actividad fagocítica de los macrófagos para la adecuada limpieza de *debris* celulares

y PMN apoptóticos, proceso conocido como eferocitosis, entre otras acciones que controlan la magnitud y la duración de un proceso inflamatorio, promoviendo la regeneración de los tejidos (**Figura 1**) (Serhan, 2014; Serhan & Levy 2018).

La inflamación persistente y no controlada juega un rol central en muchas patologías, como: enfermedades cardiovasculares, enfermedades neurodegenerativas, enfermedad intestinal inflamatoria, síndrome metabólico, entre otras, lo que ha permitido sugerir que el deterioro de las vías resolutivas puede ser clave en la etiología de estas enfermedades (Chiang & Serhan 2020).

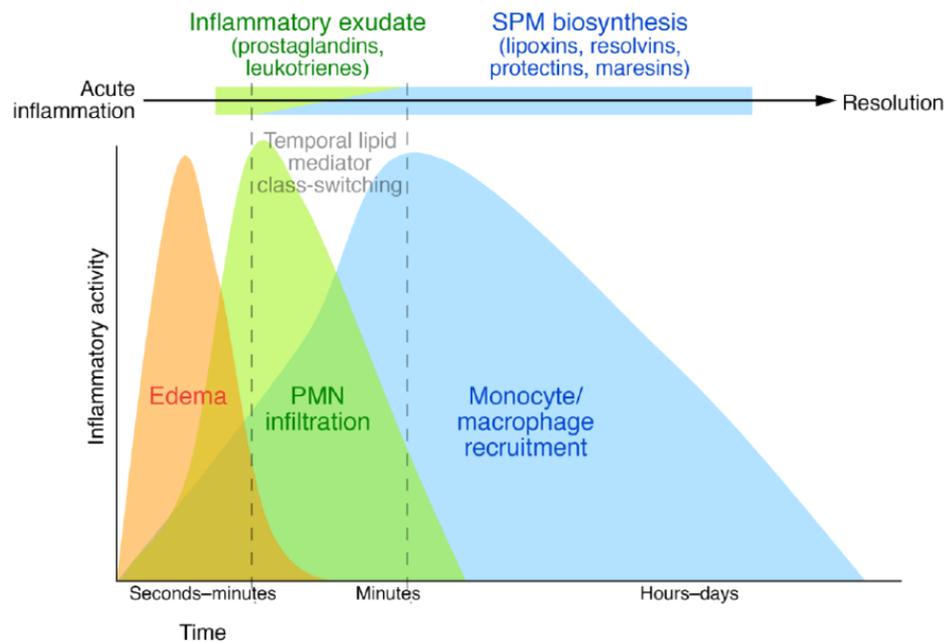


Figura 1. Esquema de la respuesta inflamatoria aguda y su resolución en el tiempo. Un proceso inflamatorio agudo cursa con edema, infiltración de PMN y mononucleares al lugar de la lesión. La reducción en el infiltrado de PMN coincide con la biosíntesis de lipoxinas, resolvinas, protectinas y maresinas. Ocurre un *switch* en la biosíntesis de mediadores proinflamatorios a proresolutivos, que restauran la homeostasis y culminan con el proceso inflamatorio. Modificado de Serhan & Levy, 2018.

1.3.1 BIOSÍNTESIS DE SPM

Los SPM se biosintetizan a partir de ácidos grasos poliinsaturados esenciales: el ácido araquidónico (AA), ácido docosahexaenóico (DHA) y ácido eicosapentaenóico (EPA) (Chiang & Serhan 2020). Se producen por vía transcelular gracias a la acción de enzimas lipoxigenasas (LOX) presentes en los leucocitos, plaquetas y células endoteliales (Basil & Levy, 2016). Brevemente y tal como se observa en la **Figura 2**, las Lxs se forman a partir del AA, mediante la acción secuencial de enzimas LOX, generando un intermediario 15(S)-ácido hidroxieicosatetraenoico (15(S)-HETE), y posteriormente Lxs, como: LXA₄ (Chiang & Serhan 2020). Por su parte, las resolvinas son derivadas del DHA y EPA, generando las Rvs de la serie D y E, respectivamente. Así, a partir del DHA por acción de 15-LOX se produce un intermediario 17 (S)-hidroperoxi-DHA (17(S)-HpDHA), el cual, es posteriormente sustrato de 5-LOX produciendo las RvD1-RvD6. A partir del EPA, mediante la acción del sistema microsomal P450 se produce un intermediario 18 (S)-hidroperoxi-EPA (18(S)-HEPE), que, en conjunto con la acción de LOX dan lugar a las RvE1-RvE3 (Serhan y Levy 2018). Por último, las maresinas y protectinas son derivadas de los intermediarios del DHA a partir de reacciones de hidrólisis y epoxidación (Chiang & Serhan 2020).

Adicionalmente, la biosíntesis de SPM puede ser inducida por ciertos fármacos, entre ellos, el ácido acetilsalicílico (ASA), el cual, modifica la actividad de la enzima ciclooxigenasa 2 (COX-2) por acetilación. Esta modificación permite la generación de epímeros de intermediarios, como: 15(R)-HETE y 17(R)-HpDHA, los cuales, son sustrato de 5-LOX, obteniendo como producto final epímeros de Lxs (15-epi-LXA₄) y Rvs, dependiendo del ácido graso precursor. Es por esto que, los SPM inducidos por la acetilación de la COX-2 adquieren la denominación “gatillados por aspirina” (AT: del inglés *aspirin triggered*), como la resolvina D1 gatillada por aspirina (AT-RvD1) (Basil & Levy 2016; Serhan & Levy 2018).

En cuanto a su metabolismo, los SPM son rápidamente inactivados por acción de la prostaglandina deshidrogenasa (Chiang & Serhan 2020). Sin embargo, los epímeros gatillados por aspirina, tienen la ventaja de ser más estables a la inactivación enzimática

que las moléculas endógenas (Sun et al., 2007) y han demostrado propiedades antiinflamatorias y proresolutivas prometedoras en el tratamiento de diversas patologías inflamatorias (Serhan & Levy 2018).

Hay evidencia de que la administración exógena de lipoxinas o resolvinas reduce los procesos inflamatorios (Serhan et al., 2014; Fullerton & Gilroy 2016). Durante la infección con *T. cruzi*, lípidos proresolutorios como 15-epiLXA₄ y RvD1 han sido asociados con una disminución de la inflamación y fibrosis, incrementando la sobrevivencia del hospedero en modelos murinos de CCC (González-Herrera et al., 2017; López-Muñoz et al., 2018). Por lo tanto, *potenciar la resolución de la inflamación ofrece una oportunidad para mejorar las terapias existentes y limitar el estado perjudicial inducido por T. cruzi.*

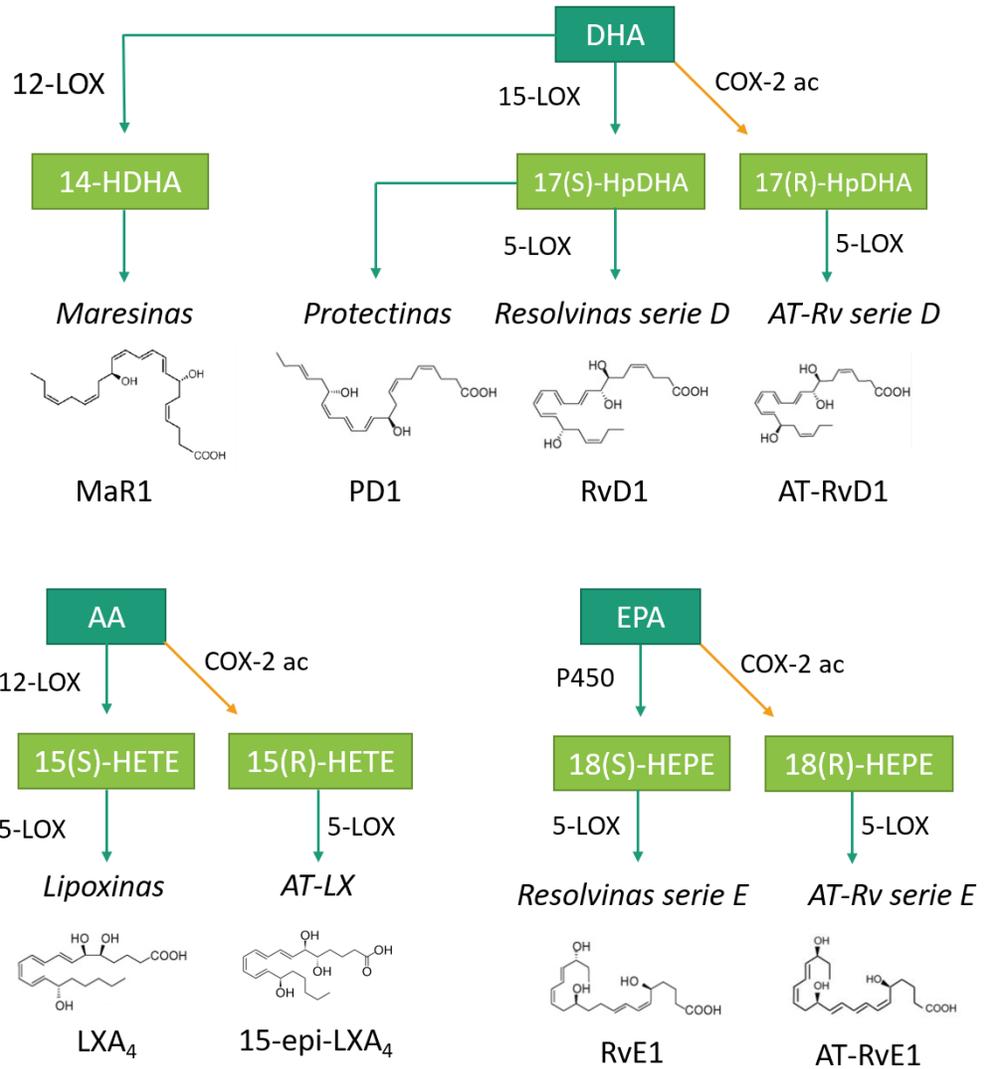


Figura 2. Esquema de las rutas biosintéticas de SPM y epímeros gatillados por aspirina. En el esquema se destacan: los ácidos grasos precursores de los SPM, las enzimas que median la biosíntesis (ciclooxigenasa – 2 (COX-2), lipoxigenasas (LOX), sistema microsomal P450 (P450)), los intermediarios generados en cada una de las rutas biosintéticas, los epímeros generados por acción de la COX-2 acetilada por aspirina, como también, las estructuras de los principales representantes de cada clase.

1.3.2 RECEPTORES DE SPM

Las propiedades antiinflamatorias y proresolutivas de los SPM son traducidas por receptores acoplados a proteína G (GPCR). Hasta el momento, han sido identificados cinco receptores: FPR2/ALX, DRV1/GPR32, DRV2/GPR18, ERV1/ChemR23, BLT1 (Park et al., 2020; Pirault and Bäck, 2018). A pesar de que cada SPM presenta actividad estereoselectiva por su receptor GPCR, hay cierto solapamiento entre la señalización río abajo, vías de activación y funciones proresolutivas (Chiang & Serhan 2020).

1.3.3 RECEPTOR DE LIPOXINA A4 O RECEPTOR FORMILPEPTIDO 2 (ALX/FPR2)

FPR2, es un receptor acoplado a proteína G_i (Zhuang et al., 2020), que inicialmente fue descubierto como receptor de productos bacterianos formilados (N-formil-metionina-leucina-fenilalanina; NfMLF). Juega un rol importante en la defensa del hospedero, inflamación y resolución. Se expresa predominantemente en células del sistema inmune, como también en células endoteliales, fibroblastos y células epiteliales. Su expresión en superficie se incrementa tras estímulos proinflamatorios como $TNF\alpha$ o IL-8 (Park et al., 2020; Caso et al., 2021).

Tiene una destacada versatilidad, ya que puede ser activado por una variedad de ligandos de distinta naturaleza química como: lípidos y proteínas. (Park et al., 2020; Schmitz et al., 2020) y, además, puede participar en procesos pro y antiinflamatorios dependiendo del ligando que lo active. De esta forma, FPR2 puede reconocer ligandos proinflamatorios, como: péptidos formilados derivados de bacterias, proteína amiloide A sérica (SAA) y péptido antimicrobiano humano LL-37, los cuales promueven la quimiotaxis de monocitos y neutrófilos, inducen la producción de quimioquinas en células endoteliales, monocitos y PMN, y median la producción de superóxido en neutrófilos, participando así en la respuesta inflamatoria. Por el contrario, FPR2 también reconoce mediadores proresolutivos, como: Lxs (LXA_4 y 15-epi- LXA_4), Rvs (RvD1 y AT-RvD1) y Anexina A1, a partir de los cuales participa en el término de la respuesta inflamatoria limitando la migración de los PMN, inhibiendo la biosíntesis de mediadores proinflamatorios, citoquinas y quimioquinas, e induciendo la liberación de citoquinas antiinflamatorias, entre otros efectos (Cattaneo et al., 2013; Caso et al., 2021).

En cuanto a la activación del FPR2, los ligandos proteicos y lipídicos se unen en distintos sitios del receptor FPR2, por ejemplo: la lipoxina A₄ (LXA₄) se unen al dominio 7 transmembrana y al tercer bucle extracelular, mientras que ligandos peptídicos, como Annexina A1 o el péptido amiloide sérico A (SAA), se unen al dominio NH₂-terminal (Tylek et al., 2021). Los efectos observados después de la activación de FPR2 incluyen la activación de las isoformas de fosfolipasa A₂ (PLA₂), fosfolipasa C (PLC), proteína quinasa C (PKC), fosfoinositol 3-quinasa (PI3K), proteína quinasa B (Akt), mitógeno- vía de proteína quinasa activada (MAPK) así como p38, que modulan la proliferación, diferenciación, apoptosis, comunicación celular y otras funciones intracelulares (Tylek et al., 2021).

La activación y tipo de respuesta desencadenada por FPR2 no solo está determinada por la naturaleza del ligando, sino también por la formación de homo y heterodímeros con otros miembros de la familia FPRs (FPR1 y FPR3). Se ha demostrado que ligandos proresolutivos como Annexina A1 y Lipoxina A₄, inducen su homodimerización (FPR2/FPR2), mientras que, agonistas proinflamatorios como AC2-26 estimulan la heterodimerización (FPR1/FPR2) (Cattaneo et al., 2019). Sin embargo, el mecanismo de activación por agonistas pro y antiinflamatorios permanece sin dilucidarse completamente (Zhuang et al., 2020). Ligandos proinflamatorios de FPR2 desencadenan cascadas de señalización celular como incremento de la concentración de calcio intracelular, activación de PI3K y proteínas GTPasas pequeñas como RhoA (Cattaneo et al., 2013). Mientras que, la interacción con ligandos proresolutivos no produce cambios en la concentración de calcio intracelular y reduce los niveles de AMPc inducidos por forskolina (Ge et al., 2020).

La actividad del receptor FPR2 es regulada gracias a la desensibilización mediada por β -arrestina, frente péptidos proinflamatorios a concentraciones del rango nM, y a concentraciones del rango μ M en caso de lípidos proresolutivos (Ge et al., 2020). Además, se ha reportado que se presenta un “*cross-talk*” con el receptor del Factor Activador Plaquetario (PAFR) y el receptor de ATP (P2Y₂R), los cuales pueden inducir su reexposición en superficie y regresarlo a su estado activo (Gabl et al., 2014).

En ausencia del receptor FPR2, modelos celulares han demostrado que se compromete el proceso resolutivo. En macrófagos se aprecia un deterioro de la eferocitosis estimulada

por LXA₄ (Maderna et al., 2010), también, se reduce la apoptosis de PMN (Barnig et al., 2013). Además, en modelos murinos, la ausencia del receptor FPR2 conduce a disfunción endotelial, disfunción diastólica, cardiomiopatía, obesidad, reducida supervivencia y envejecimiento (Tourki et al., 2020). Estos animales presentan una exacerbada respuesta inflamatoria frente a la estimulación con LPS, con una incrementada producción de citoquinas proinflamatorias (TNF α , IL-6, IFN- β e IFN γ) (Wang et al., 2018). Después de un daño cardíaco, ratones FPR2^{-/-} muestran una baja expresión de LOX y consecuentemente un mayor grado de inflamación tisular, además, los macrófagos muestran un deterioro de su función fagocítica, sugiriendo que el bloqueo de las funciones de FPR2 deteriora la biosíntesis de SPM amplificando la inflamación y el daño cardíaco (Tourki et al., 2020; Caso et al., 2021; Chiang & Serhan 2020).

Es interesante que, siendo FPR2 un potencial blanco terapéutico por su relevancia en los procesos inflamatorios, hasta el momento son escasos los estudios acerca del rol de este receptor durante la EC y su participación en la respuesta inmune durante las distintas fases de la infección con *T. cruzi*. *Debido a su versatilidad y a su rol en el balance de la respuesta inflamatoria, surge la propuesta de utilizar agonistas proresolutorios de este receptor en la fase crónica de la EC.*

1.3.4 RESOLVINA D1 GATILLADA POR ASPIRINA (AT-RvD1)

AT-RvD1 presenta bioactividad a concentraciones entre picomolar y nanomolar. Sus acciones son mediadas por señalización vía receptor ALX/FPR2 y GPR32 (Chiang & Serhan, 2020; Pirault & Bäck 2018).

Los efectos antiinflamatorios y acciones proresolutivas de AT-RvD1 han sido estudiados en diversos modelos experimentales de inflamación tanto *in vitro* como *in vivo* (Serhan et al., 2014). En modelos experimentales de colitis, AT-RvD1 se ha destacado por su efectividad en prevenir el daño del colon al reducir el infiltrado inflamatorio, citoquinas proinflamatorias (TNF α , IFN γ e IL-1 β), quimioquinas, moléculas de adhesión vascular e inhibir una de las más importantes vías de señalización inflamatoria, la vía NF κ B, al reducir la fosforilación de p65 mediante el receptor ALX/FPR2 (Bento et al., 2011). En enfermedades autoinmunes inflamatorias crónicas como el Síndrome de Sjögren, el tratamiento con AT-RvD1 disminuye la progresión de la enfermedad, mejora la función

secretoria glandular, reduce la expresión de genes proinflamatorios (citoquinas y quimioquinas) e induce la polarización de los macrófagos hacia un fenotipo proresolutivo (Wang et al., 2017). A nivel cardiovascular, se ha demostrado que de manera dosis dependiente disminuye el infiltrado de PMN, las moléculas de adhesión celular y vascular, la generación de especies reactivas de oxígeno y la expresión de genes proinflamatorios en células de músculo liso vascular (Miyahara et al., 2013). Con ello, AT-RvD1 reduce la migración de las células musculares lisas y la hiperplasia de la pared arterial, en modelos experimentales de aterosclerosis (Mottola et al., 2017). En modelos murinos de infarto agudo al miocardio, RvD1 reduce el infiltrado inflamatorio, la producción de citoquinas proinflamatorias y quimioquinas, reduce la expresión de genes profibróticos y disminuye los depósitos de colágeno, restableciendo la homeostasis del tejido y mejorando la función del ventricular (Kain et al., 2015). Recientemente se ha evidenciado que, RvD1 atenúa la inflamación y el remodelado cardiaco en un modelo experimental de hipertensión inducida por angiotensina II (Olivares-Silva et al., 2021).

Las enfermedades cardiovasculares como, aterosclerosis, miocarditis, infarto agudo al miocardio, fibrilación auricular, entre otras, tienen en común un estado inflamatorio no resuelto que contribuye a la cronicidad, gravedad y morbilidad de la enfermedad. (Hiram, 2022). *Por lo tanto, mediadores proresolutivos de la inflamación como AT-RvD1 son, hoy en día, una prometedora estrategia terapéutica para estas patologías.*

1.3.5 MECANISMO DE ACCIÓN DE RVD1 Y AT-RVD1

Aunque el mecanismo de acción de RvD1 y AT-RvD1 no se conoce detalladamente, se ha reportado que, en macrófagos, actúan inhibiendo la vía del factor nuclear κ B (NF κ B) en dos niveles; 1) disminuye la fosforilación de la proteína kinasa de I κ B (IKKB) y con ello reduce la fosforilación y degradación proteasomal de p65, suprimiendo la traslocación nuclear de p65/p50 y la expresión de genes proinflamatorios, 2) mediante la actividad de ERK1/2, promueve la fosforilación y degradación proteasomal de p105 para generar subunidades p50, y con ello, la formación y traslocación nuclear del homodímero p50/p50, el cual actúa como represor transcripcional de genes proinflamatorios. Esto, se ha relacionado con una reducción en la expresión de TNF α e IL-1 β , y un incremento de IL-

10, promoviendo la eferocitosis de los macrófagos (**Figura 3**) (Lee et al., 2013; Gao et al., 2017).

Adicionalmente, se ha sugerido que las Rvs de la serie D y las maresinas fosforilan a la proteína GSK3 β , la cual, tiene un rol crucial en la inflamación, ya que su actividad es necesaria para la producción de citoquinas proinflamatorias (TNF α , IFN γ , IL-1 β e IL-6), en monocitos estimulados con LPS (Beurel et al., 2010). Sin embargo, la fosforilación inhibitoria de GSK3 β mediada por Rvs y maresinas, permite la expresión de IL10, la principal citoquina antiinflamatoria, mediante la actividad transcripcional de CREB (Gu et al., 2016).

Como parte del mecanismo de acción de RvD1, se ha reportado que regula la expresión de cientos de genes involucrados en la inflamación y la respuesta inmune mediante micro-RNAs (miRNAs). RvD1 controla miRNAs proresolutorios específicos: miR-21, miR-146b, miR-208a y miR-219 *in vivo*. Los miRNAs de la familia miR-146 regulan la expresión de genes directamente relacionados con la respuesta inmune innata frente a patógenos, como, la proteína kinasa de I κ B (IKKB) de la vía NF κ B, el receptor de TNF α , receptores de reconocimiento de patógenos *Toll like-receptors* (TLRs), proteína C reactiva, citoquinas y quimioquinas (IL-8, IL-12, IFN γ , RANTES). Por otro lado, miR208a regula la expresión del receptor del Tromboxano A₂, receptor de PGI₂ y el supresor de tumor de muerte celular programada (PDCD4) que actúa como represor transcripcional de IL-10. RvD1 también regula miR-21, el cual promueve la supervivencia celular y proliferación por actuar sobre proteínas proapoptóticas como caspasa 3 y Bax (Recchiuti 2011; Krishnamoorthy et al., 2012).

Hasta el momento, estos antecedentes explicarían en parte sus efectos, ya que puede reducir la expresión de citoquinas proinflamatorias (TNF α , IFN γ , IL-1 β , IL-12, IL-6) y quimioquinas, a la vez de incrementar la expresión de citoquinas antiinflamatorias como IL-10. Además, disminuye el infiltrado inflamatorio, promueve la eferocitosis de los macrófagos, la remoción de los PMN apoptóticos y la polarización de macrófagos a un fenotipo proresolutivo demostrando un impacto significativo en controlar la inflamación y promover la homeostasis de los tejidos (Lee et al., 2013; Gao et al., 2017).

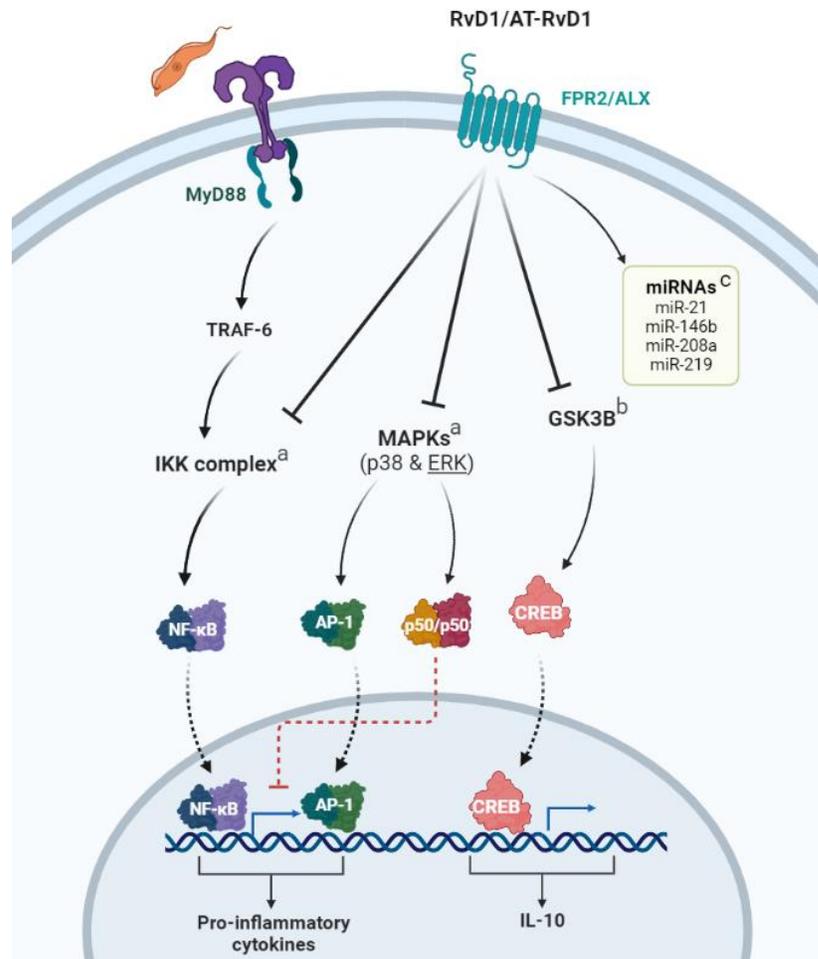


Figura 3. Esquema resumen de los mecanismos de acción descritos hasta la fecha para RvD1. Se aprecia el receptor TLR-4 y la vía clásica de señalización NFκB, que induce la expresión de genes proinflamatorios. RvD1 inhibe la vía NFκB y promueve la formación de homodímeros p50/p50 que actúan como represores de la transcripción de genes proinflamatorios (Lee et al., 2013; Gao et al., 2017)^a. RvD1 inhibe la proteína GSK3β y esto permite la transcripción génica de IL10 mediante la activación de CREB (Gu et al., 2016)^b. Adicionalmente, RvD1 induce la expresión de microRNAs que modifican la expresión de genes proinflamatorios (Rechiuti et al., 2011)^c.

1.3.6 AT-RVD1 COMO TERAPIA DE LA EC

Se ha evaluado el efecto de AT-RvD1 en células mononucleares de sangre periférica (PBMCs) provenientes de pacientes con CCC, demostrando que el tratamiento con este fármaco reduce las concentraciones de IFNγ liberado por PBMCs al ser estimuladas con

antígenos de *T. cruzi*. Además, se redujo la proliferación de las PBMC, sugiriendo un efecto supresor. Estos resultados destacan los efectos inmunomoduladores de AT-RvD1 sobre PBMC de pacientes con CCC, lo cual podría ser beneficioso para reducir el daño cardíaco (Ogata et al. 2016).

Recientemente, Horta y cols., publicaron el efecto de RvD1 en ratones infectados con *T. cruzi*, donde se demostró que tres administraciones aisladas de RvD1 durante la fase crónica reduce el infiltrado inflamatorio y la fibrosis cardíaca (Horta et al., 2020). No obstante, hasta el momento, no se ha estudiado el efecto de AT-RvD1 en un modelo murino de CCC, durante la fase crónica temprana, ni se ha comparado sus propiedades con respecto a las terapias tripanocidas existentes como el benznidazol, lo que daría lugar, en un futuro, a la evaluación de esquemas terapéuticos que puedan prevenir la progresión del daño cardíaco y alcanzar la eliminación del parásito. Además, hasta el momento se desconoce el rol de FPR2 en la mediación de los efectos proresolutivos y antiinflamatorios de AT-RvD1 en la CCC.

Considerando que: a) los tratamientos actualmente utilizados para la EC crónica, como el benznidazol, no limitan el progreso de la cardiomiopatía, b) la inflamación crónica es un factor determinante en el deterioro del tejido y el progreso de la CCC, c) AT-RvD1 ha demostrado propiedades antiinflamatorias y proresolutivas en modelos experimentales de enfermedades inflamatorias crónicas, contrarresta la producción de citoquinas y mediadores proinflamatorios hacia un medio antiinflamatorio, reduciendo el infiltrado inflamatorio y el daño tisular, además de ser más estable a la inactivación enzimática que el epímero endógeno Resolvina D1, entonces, se propone una estrategia terapéutica orientada a la modulación de la respuesta inflamatoria del hospedero, promoviendo la resolución de la inflamación crónica presente en la CCC, con la finalidad de disminuir el deterioro del miocardio y prevenir la progresión de la CCC. Por lo que se postula la siguiente hipótesis:

2. HIPÓTESIS

En la infección crónica con *T. cruzi* el tratamiento con AT-RvD1 mediante el receptor FPR2, reduce la expresión de las citoquinas proinflamatorias TNF α , IFN γ e IL-1 β e incrementa la expresión la citoquina antiinflamatoria IL-10, disminuyendo el infiltrado celular y las alteraciones histopatológicas y electrocardiográficas, limitando la progresión de la CCC, en ratones C57BL/6.

3. OBJETIVOS

3.1 OBJETIVO GENERAL

Estudiar el efecto de AT-RvD1 durante la infección crónica con *T. cruzi*, sobre el perfil de expresión de citoquinas pro y antiinflamatorias, así como también, sobre el infiltrado celular, las alteraciones histopatológicas y eléctricas en el tejido cardiaco, en un modelo murino de CCC.

3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- 3.2.1 Determinar el efecto de AT-RvD1, mediado por el receptor FPR2, sobre la expresión de citoquinas proinflamatorias (TNF α , IFN γ e IL-1 β) y antiinflamatorias (IL-10) en el tejido cardiaco de ratones C57BL/6 infectados crónicamente con *T. cruzi*.
- 3.2.2 Demostrar el efecto de AT-RvD1, mediado por el receptor FPR2, sobre el infiltrado inflamatorio, hipertrofia y fibrosis del tejido cardiaco, en el modelo murino de CCC.
- 3.2.3 Demostrar el efecto de AT-RvD1, mediado por el receptor FPR2, sobre las alteraciones electrocardiográficas en ratones C57BL/6 infectados crónicamente con *T. cruzi*.

4. MATERIALES Y MÉTODOS

4.1 ANIMALES

Se utilizaron ratones C57BL/6 silvestres (WT) y transgénicos para el receptor FPR2/ALX (FPR2^{-/-}), de 8 a 10 semanas de edad, los cuales fueron mantenidos con comida y agua *ad libitum*, en las instalaciones de Cuidados de Animales del Instituto de Ciencias Biológicas, de la Universidad Federal de Minas Gerais, Brasil. El manejo de los animales fue de acuerdo con la “Guía para el manejo y cuidado de los animales de laboratorio”. Se distribuyeron aleatoriamente siguiendo una proporción de 2 a 3 animales por caja, en un ambiente controlado de temperatura constante y ciclos de 12 horas día/noche. Todos los protocolos usados en este proyecto fueron aprobados por el comité de bioética tanto del Instituto de Ciencias Biológicas de la Universidad Federal Minas Gerais (UFMG), así como también por el comité de bioética de la Facultad de Medicina de la Universidad de Chile, bajo el protocolo 1078 FMUC del año 2019 respaldado por el proyecto FONDECYT 1170126, por cuanto el número de ratones, la infección con *T. cruzi* y duración de los tratamientos coinciden con los planteados en el presente proyecto.

4.2 OBTENCIÓN DE PARASITOS E INFECCIÓN CON *T. cruzi*

1×10^5 tripomastigotes de *T. cruzi* de la cepa Dm28c, obtenidos a partir de cultivos de células Vero infectadas, fueron inoculados intraperitonealmente en ratones C57BL/6. En el pico de la parasitemia, se recogió y combinó la sangre de varios donantes y se contaron los parásitos mediante visualización directa de una gota de sangre en el microscopio óptico. Finalmente, los tripomastigotes se suspendieron en solución salina estéril y se inyectó una suspensión de 1×10^3 tripomastigotes en 100 μ L en cada animal de experimentación. Después de la aleatorización, los animales se dividieron en grupos de cinco para conformar los grupos de control sano, y de ocho animales para los grupos de infección y tratamientos. La confirmación de la infección por *T. cruzi* se determinó mediante visualización microscópica directa de tripomastigotes circulantes en muestras de sangre periférica obtenidas de la punta de la cola desde el tercer día después de la

infección. Posteriormente, se continuó el registro de la parasitemia cada dos días hasta que no se detectó parásitos en sangre periférica (Molina-Berrios et al., 2013a).

4.3 TRATAMIENTOS

Ratones C57BL/6 WT y FPR2^{-/-} infectados con *T. cruzi*, fueron tratados con Resolvin D1 gatillada por aspirina (AT-RvD1) 5 µg/Kg/día (Cayman Chemicals®, EE. UU.) administrado por vía intraperitoneal o benznidazol 30 mg/Kg/día (Abarax - Laboratorio Elea, Argentina) administrado por vía oral (sonda de gavage). En cuanto a la preparación de los fármacos, AT-RvD1 se disolvió en etanol al 0.01% y el benznidazol se disolvió en una suspensión de carboximetilcelulosa al 0,5%. Los tratamientos se administraron durante 20 días, desde el día 40 hasta el 60 p.i. El día 60 p.i., los animales se sacrificaron con una mezcla de 100 mg/Kg de ketamina y 10 mg/Kg de xilacina, y luego, se extrajo sangre y corazón de cada uno de los animales. Los corazones se dividieron en dos, donde, cada mitad correspondía mayormente a cavidades ventriculares. De esta manera, una mitad fue fijada en formaldehído al 4% en solución salina tamponada con fosfato 0,1 M (PBS; pH 7,3) y la otra mitad en TRIzol™ (Invitrogen, EE.UU.) para realizar análisis histológicos y RT-qPCR, respectivamente.



Figura 4. Esquema de infección y tratamiento del modelo experimental utilizado.

4.4 ELISA

Se recolectaron muestras de sangre periférica de ratones C57BL/6 mediante una punción submandibular los días 20 y 40 p.i. Adicionalmente, el día 60 p.i, se extrajo sangre

completa después de la eutanasia. Esta sangre se centrifugó y el suero resultante fue almacenado a -80 °C hasta ser analizado. A partir de estas muestras de suero se determinó la concentración de TNF α (Cat. No. 430904, Biolegend ®), IL-1 β (Cat. No. 432604, Biolegend ®), IFN γ (R&D Systems ®) e IL-10 (Cat. No. 431414, Biolegend ®). La cuantificación de citoquinas se realizó mediante ELISA utilizando anticuerpos monoclonales de ratón específicos del ELISA Max Deluxe Set para TNF α , IFN γ , IL-1 β e IL-10 de ratón (Biolegend, EE. UU.), siguiendo las instrucciones del fabricante. Las placas de ELISA se leyeron a 450 nm en un lector de microplacas Biotek Elx800 (Winooski, EE. UU.). Todas las muestras se analizaron por duplicado.

4.5 TRANSCRIPCIÓN INVERSA Y REACCIÓN EN CADENA DE LA POLIMERASA CUANTITATIVA (RT-qPCR).

Para medir la expresión génica de citoquinas, marcadores de inflamación, hipertrofia y fibrosis en el tejido cardíaco, los corazones de los animales fueron homogeneizados y se extrajo el RNA total usando el reactivo TRIzol® (Invitrogen®,USA), seguido de su purificación mediante un kit de columna para la extracción de RNA (ThermoFisher, PureLink RNA Mini Kit), de acuerdo con las instrucciones del fabricante. El DNA complementario (cDNA) se sintetizó a partir de 600 ng de RNA total mediante transcripción inversa utilizando transcriptasa inversa M-MLV y random primers (Invitrogen). Las reacciones de qPCR se realizaron con SYBR® Green PCR Master Mix (Bioline®), cada mezcla de reacción contenía 150 nM de cada partidor (forward and reverse), 1 ng de cDNA de las muestras, 7 μ L de SensiMix® SYBR Green Master Mix (Bioline ®) y H₂O para un total de 15 μ L. Se utilizaron los partidores indicados en la **Tabla 1**. La amplificación se realizó en un detector de secuencias ABI Prism 7300 (Applied Biosystems®, EE. UU.). El programa de ciclos fue el siguiente: un paso de desnaturalización a 95 ° C durante 3 min y 40 ciclos de amplificación de 95 ° C (15 s), 60 ° C (15 s) y 72 ° C (30 s). El paso final fue una etapa de disociación que osciló entre 60 y 95 ° C (100 s). Cada muestra se realizó en duplicado y la expresión génica relativa se analizó utilizando el método del doble control comparativo ($\Delta\Delta$ Ct) (55). Los niveles de RNA se relativizaron utilizando GAPDH como gen constitutivo.

Target	Especie	Secuencia (5'-3')	
IL-1 β	<i>Mus musculus</i>	F	TGCCACCTTTTGACAGTGATG
		R	GTGCTGCTGCGAGATTTGAA
IL-10	<i>Mus musculus</i>	F	ACCTGGTAGAAGTGATGCCC
		R	ACAGGGGAGAAATCGATGACAG
TNF α	<i>Mus musculus</i>	F	TAGCCACGTCGTAGCAAAC
		R	ACAAGGTACAACCCATCGGC
IFN γ	<i>Mus musculus</i>	F	GAGGAACTGGCAAAGGATGGTG
		R	GCTGATGGCCTGATTGTCTTTC
ANP	<i>Mus musculus</i>	F	GGGCTTCTCCTCGTCTTGG
		R	GTGGTCTAGCAGGTTCTTCAAAT
BNP	<i>Mus musculus</i>	F	CAGAGCAATTCAAGATGCAGAAGC
		R	CTGCCTTGAGACCGAAGGAC
VCAM	<i>Mus musculus</i>	F	CGTGGACATCTACTCTTTCCCC
		R	GCCAAACACTTGACCGTGAC
ICAM	<i>Mus musculus</i>	F	CCATCACCGTGTATTCGTTTCC
		R	CAGTATCTCCTCCCCACGGA
α SMA	<i>Mus musculus</i>	F	ACGCCAGCCTCTGAAACTAGA
		R	GCCGTTGTCACACACAAGAG
GAPDH	<i>Mus musculus</i>	F	GGAGAGTGTTTCCTCGTCCC
		R	ATGAAGGGGTCGTTGATGGC
Tc18S rRNA	<i>T. cruzi</i>	F	TGGAGATTATGGGGCAGT
		R	GTTCGTCTTGGTGCGGTCTA

Tabla 1. Partidores utilizados en los ensayos de RT-qPCR.

4.6 CARGA PARASITARIA

La presencia de parásitos viables en el tejido cardíaco se evaluó mediante la amplificación del RNA 18S de *T. cruzi*. Para este propósito, se aisló el RNA total de los corazones usando TRIzol TM, seguidamente, se purificó a través de un kit de columna para la extracción de RNA (Thermofisher, PureLink RNA Mini Kit) y se sintetizó el ADNc como se detalló anteriormente. Las reacciones para RT-qPCR se prepararon como se describió, utilizando los primers indicados en la **Tabla 1**. La amplificación se realizó en un detector

de secuencia ABI Prism 7300 (Applied Biosystems®, EE. UU.), y se aplicó el método de curva estándar.

La curva de calibración fue construida a partir de 1×10^8 tripomastigotes de *T. cruzi* (DM28c), los cuales, fueron diluidos en serie para proporcionar una curva logarítmica en un rango de 1 a 10^8 parásitos equivalentes. Una vez obtenidas las diluciones de parásitos, se extrajo el RNA a cada una de ellas y se sintetizó el cDNA correspondiente. Al realizar la PCR cuantitativa se pudo construir una gráfica de Ct en función del número de parásitos, y en base a esta curva, se pudo obtener la carga parasitaria en el corazón de los animales.

4.7 HISTOLOGÍA

Los corazones se fijaron en formaldehído 4% (pH 7.3) por 24 horas a temperatura ambiente. Luego, se deshidrataron con un gradiente de etanol 50 a 100%, se clarificaron con xilol y fueron embebidos en parafina. Posteriormente, se realizaron cortes de 5 μm para realizar las tinciones; i) Hematoxilina y eosina para observar la infiltración celular y el área transversal de las fibras musculares cardíacas, ii) tinción con rojo picro-sirio para observar los depósitos de colágeno. Las imágenes se obtuvieron en un microscopio BX43 (Olimpus®), con el cual se capturaron 5 campos aleatorios no consecutivos por corazón. Las imágenes fueron analizadas mediante el software Image J®.

Para el análisis del infiltrado celular se cuantificaron los núcleos presentes en cinco campos de cada corazón. En cada campo se obtuvo el número de núcleos por área de tejido, considerando eliminar las áreas vacías o libres de tejido de cada campo. En el análisis del área transversal de los cardiomiocitos, solo se incluyeron fibras musculares con bordes bien definidos y un núcleo en su interior. Para el análisis de la fibrosis, en los portaobjetos teñidos con rojo picro-sirio, se cuantificaron los píxeles de coloración roja correspondiente a colágeno en el tejido cardíaco, en cinco campos por animal.

4.8 INMUNOFLUORESCENCIA

4.8.1 Inmunotinción p65

Para determinar la activación de la vía de señalización NFκB, cortes de tejido cardíaco fueron incubados con el anticuerpo anti-NFκB p65 (D14E12 Rabbit mAb #8242, Cell Signaling) en una dilución 1:75. Seguidamente, se incubó con el anticuerpo secundario anti-rabbit IgG conjugado con Alexa 488 (Cell Signaling Technology #4412S) en una dilución 1:1000. Posteriormente, los tejidos fueron incubados con DAPI (4, 6-diamidino-2-phenylindole, Molecular Probes; 1 mg DAPI/ml) con el objetivo de identificar los núcleos celulares. Finalmente, los tejidos fueron recubiertos y sellados con medio de montaje (ProLong™ Diamond Antifade Mountant, Thermo Fisher). Las imágenes fueron obtenidas por microscopía confocal (Microscopio confocal C2 plus, servicio Facility ICBM). Se obtuvieron imágenes de 5 campos aleatorios por corazón, cada campo fue capturado a lo largo del eje z, en al menos 10 slides, y a partir de las mismas, se cuantificó la colocalización de p65 y DAPI, por cada condición experimental, utilizando el software ImageJ 1.47v.

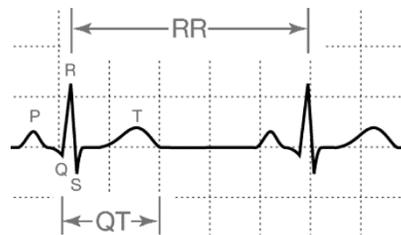
4.8.2 Inmunotinción CD4⁺ IFNγ⁺

Para determinar la proporción de células CD4⁺ productoras de IFNγ, cortes de corazón fueron incubados con: i) anticuerpo anti-IFNγ (Goat Ab AF-585-NA, R&D systems, byotechne ®) en una dilución 1:100, y ii) anticuerpo monoclonal Anti-CD4 (D7D2Z Rabbit mAB #25229, Cell Signaling Technology) en una dilución 1:100. Seguidamente, los cortes de tejido fueron incubados con anticuerpos secundarios: anti-goat IgG conjugado a FITC (#31509, Thermo Fisher Scientific), en una dilución 1:400 y anti-rabbit IgG conjugado a Alexa 594 (#8889, Cell Signaling Technology), en una dilución 1:1000. Posteriormente, los tejidos fueron incubados con DAPI (4, 6-diamidino-2-phenylindole, Molecular Probes; 1 mg DAPI/ml) con el objetivo de identificar los núcleos celulares. Finalmente, los tejidos fueron recubiertos y sellados con medio de montaje (ProLong™ Diamond Antifade Mountant, Thermo Fisher). Las imágenes fueron obtenidas por microscopía confocal (Microscopio confocal C2 plus, servicio Facility ICBM). Se obtuvieron imágenes de 5 campos aleatorios por corazón, y a partir de las cuales, se

cuantificaron las células CD4⁺ productoras de IFN γ por cada condición experimental, utilizando el software ImageJ 1.47v.

4.9 ELECTROCARDIOGRAMA (ECG)

Los electrocardiogramas fueron leídos con un electrocardiógrafo no invasivo de seis canales (ECG-PC versión 2.07, Tecnología electrónica de Brasil (TEB), Belo Horizonte, MG, Brasil), durante 3 minutos. Los ratones fueron levemente anestesiados con isoflurano 2.5% y mantenidos con isoflurano 1.5% (VetCase - Incotec, Serra/ES, Brasil). Los roedores se colocaron en posición de decúbito dorsal sobre una mesa de madera cubierta con material plástico; Se aplicó gel electrocardiográfico y se colocaron cuatro electrodos de pinza de cocodrilo en la piel de las extremidades anteriores y posteriores. Todos los procedimientos se realizaron en una habitación tranquila para minimizar el estrés. Para el análisis del trazado del ECG, todos los ECG fueron realizados y analizados por el mismo veterinario de acuerdo con métodos estándar. Se registraron trazados en seis derivaciones del plano frontal, con 50 mm/s de velocidad. En cada trazado, se seleccionaron tres segmentos, que contenían cinco latidos (derivación II) por su calidad (línea de base limpia sin artefactos) y valores medios para la frecuencia cardíaca (FC), y se determinó la duración de los intervalos y ondas. Los parámetros evaluados fueron frecuencia cardíaca, onda P, complejo QRS, intervalos PR y QT. Los valores corregidos de QT se obtuvieron a partir de la ecuación de Bazett:



$$QTc = \frac{\text{intervalo QT (seg)}}{RR \text{ (ciclo cardiaco seg)}}$$

Figura 5. Trazado electrocardiográfico y ecuación de Bazett. A la izquierda se detalla el conjunto de ondas e intervalos que conforman el trazado electrocardiográfico. A la derecha se encuentra la ecuación de Bazett utilizada para el cálculo del intervalo QT corregido.

4.10 ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Para todos los experimentos, los datos representan las medias y las desviaciones estándar del experimento, cuyo tamaño de la muestra varía de $n=5$ (grupos control) a $n=8$ (grupos infectados y/o tratados), dependiendo del análisis. Todos los datos fueron inicialmente analizados con la prueba de normalidad Shapiro-Wilk. Una vez confirmada la distribución normal de los datos, el análisis de varianza se realizó con ANOVA de dos vías seguido de un post test de Tukey. Este análisis se utilizó para evaluar cambios tanto en ratones silvestres como transgénicos y a su vez para comparar entre los genotipos cambios inducidos por la infección o por los tratamientos. Un valor de $p \leq 0,05$ fue considerado estadísticamente significativo. La supervivencia de los ratones de los distintos grupos se analizó por el método de Mantel-Cox, el cual utiliza el análisis estadístico log-rang. Todos los análisis estadísticos se realizaron utilizando el software Prisma 8.0 (GraphPad Prism, USA).

5. RESULTADOS

5.1 VALIDACIÓN DEL MODELO MURINO DE EC CRÓNICA.

Con la finalidad de validar el establecimiento de un modelo murino para la EC crónica, se determinó la progresión de la parasitemia y la supervivencia de los ratones C57BL/6 WT y FPR2^{-/-} infectados con la cepa Dm28c de *T. cruzi* (Figura 6). En cuanto a la parasitemia, se puede observar que, tanto en los ratones WT como en los FPR2^{-/-} se detectaron parásitos en sangre desde el día 9 postinfección (p.i) hasta el día 40 p.i, (Figura 6A). La cinética general durante la fase aguda fue similar entre ratones WT y FPR2^{-/-}, aunque el *peak* de parasitemia (día 27 p.i) fue menor en los ratones FPR2^{-/-}. Además, las tasas de supervivencia fueron altas para todos los ratones hasta el final del experimento (Figura 6B), independientemente de su *background* genético, lo que confirma el establecimiento una infección crónica por *T. cruzi* con una baja mortalidad.

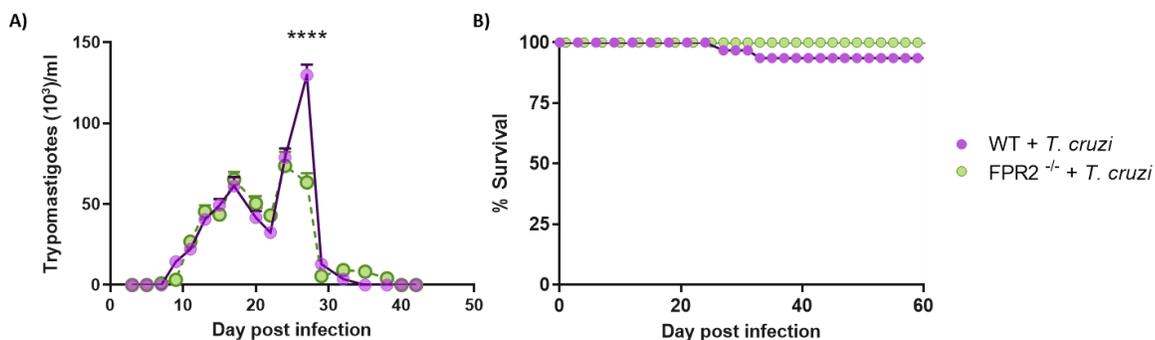


Figura 6. Parasitemia y supervivencia en ratones C57BL/6 *Wild-type* (WT) o *knockout* para FPR2 (FPR2^{-/-}) infectados con *T. cruzi* (Dm28c). A) Niveles de parásitos en sangre. Los datos se expresan como la media \pm DS de quince animales por grupo experimental. Se realizó ANOVA de dos vías para identificar diferencias significativas; **** $p \leq 0,0001$. B) Supervivencia. Los datos representan el porcentaje de individuos supervivientes en cada punto de observación y el análisis estadístico corresponde a un test de Log-rank (Mantel-Cox).

Como parte de la validación del modelo experimental, se determinaron los niveles séricos de citoquinas proinflamatorias (TNF α , IFN γ , IL-1 β) y antiinflamatorias (IL-10) en los días 20, 40 y 60 p.i, en ratones WT y FPR2^{-/-} infectados con *T. cruzi* (Figura 7A, C, E y G).

Inicialmente, entre los ratones WT y FPR2^{-/-} sanos hubo diferencias en los niveles séricos de citoquinas; detalladamente, los ratones FPR2^{-/-} sanos presentaron niveles elevados de TNF α e IL-10 en comparación con WT sanos. A los 20 días postinfección (d.p.i), se observa un incremento significativo de todas las citoquinas estudiadas en ratones WT y FPR2^{-/-}, producto de la infección. Sin embargo, se puede destacar que, la magnitud de la respuesta inmune en ratones WT fue mayor que en FPR2^{-/-}, especialmente en los niveles de TNF α , IFN γ e IL-10 al día 20 p.i. (Figura 7B, D, F y H). Además, se observa que, al día 40 p.i, los ratones WT infectados mantienen niveles ligeramente aumentados de TNF α (Figura 7A-B) e IFN γ (Figura 7C-D) en comparación con su control sano, mientras que, en los ratones FPR2^{-/-}, solo se mantuvo aumentado el IFN γ . Así, en conjunto, tanto los ratones WT como los FPR2^{-/-} responden frente al parásito con una intensa producción de citoquinas proinflamatorias (TNF α , IFN γ , IL-1 β) y antiinflamatorias (IL-10), y aún al iniciar la fase crónica se mantienen levemente incrementadas las citoquinas proinflamatorias, sin embargo, entre los ratones WT y FPR2^{-/-} difieren en la magnitud de la respuesta frente al parásito (Figura 7).

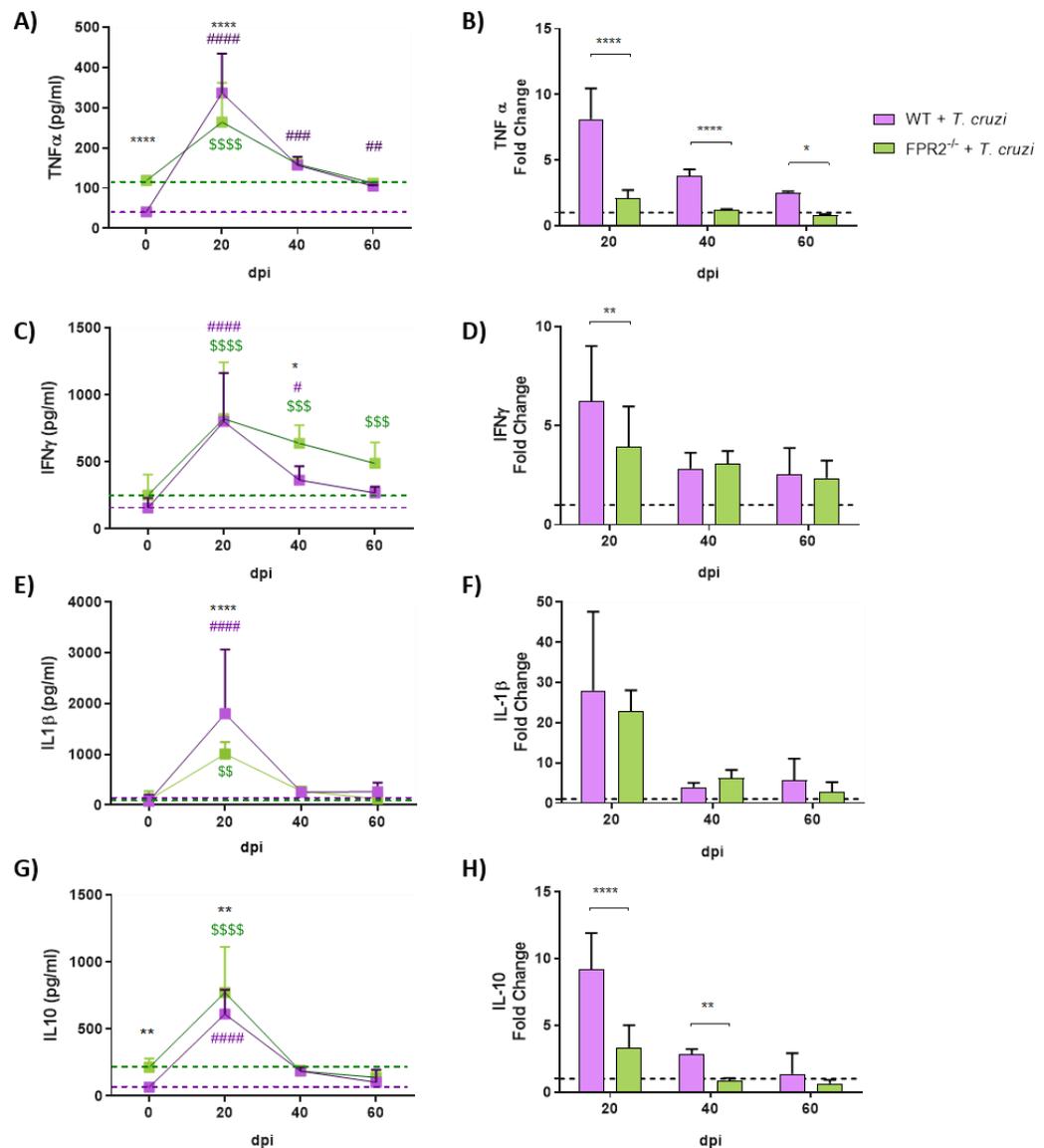


Figura 7. Niveles de citoquinas en ratones infectados con *T. cruzi* a 20, 40 y 60 d.p.i. Las concentraciones de TNF α (A-B), IFN γ (C-D), IL-1 β (E-F) e IL-10 (G-H) se cuantificaron en el suero de ratones C57BL/6 no infectados e infectados con *T. cruzi* a los 20, 40 y 60 días postinfección (d.p.i), mediante ensayos de ELISA. Los datos se expresan como la media \pm DS de un experimento de 5 animales por grupo experimental. Se realizó un ANOVA de dos vías, seguido del post-test de Tukey para identificar diferencias significativas. * indican diferencias significativas entre los ratones WT infectados y los ratones FPR2^{-/-} infectados. # indica diferencias significativas entre WT sano y WT infectado. \$ indican diferencias significativas entre FPR2^{-/-} sano y FPR2^{-/-} infectado. * p \leq 0,05, ** p \leq 0,01, *** p \leq 0,001, **** p \leq 0,0001

5.2 EFECTO DE AT-RvD1 SOBRE LA RESPUESTA INMUNE EN EL MODELO MURINO DE EC CRÓNICA.

5.2.1 AT-RvD1 reduce los niveles séricos de IFN γ e IL-1 β en ratones C57BL/6 infectados con *T. cruzi*, en una acción mediada por FPR2.

El efecto de AT-RvD1 sobre la inflamación en la EC crónica se evaluó midiendo los niveles de citoquinas séricas al final de los tratamientos (60 d.p.i.). Así y de acuerdo con un estado inflamatorio crónico, los niveles séricos de citoquinas proinflamatorias como TNF α (Figura 8A), IFN γ (Figura 8B) e IL-1 β (Figura 8C) se encontraron aumentados como resultado de la infección en ratones WT y FPR2^{-/-}. Inesperadamente, AT-RvD1 no redujo los niveles séricos de TNF α en ratones WT (Figura 8A); sin embargo, si redujo significativamente los niveles séricos de IFN γ (Figura 8B) e IL-1 β (Figura 8C), alcanzando niveles similares a los del control sano. Aparentemente, este efecto fue mediado por el receptor FPR2, porque en los ratones FPR2^{-/-}, AT-RvD1 no modificó los niveles de IFN γ e IL-1 β . Adicionalmente, el tratamiento con AT-RvD1 mostró una tendencia a incrementar los niveles séricos de IL-10 (Figura 8D); sin embargo, no fue estadísticamente significativo (p=0.0842). Con respecto al benznidazol, este tratamiento no afectó los niveles séricos de las citoquinas analizadas.

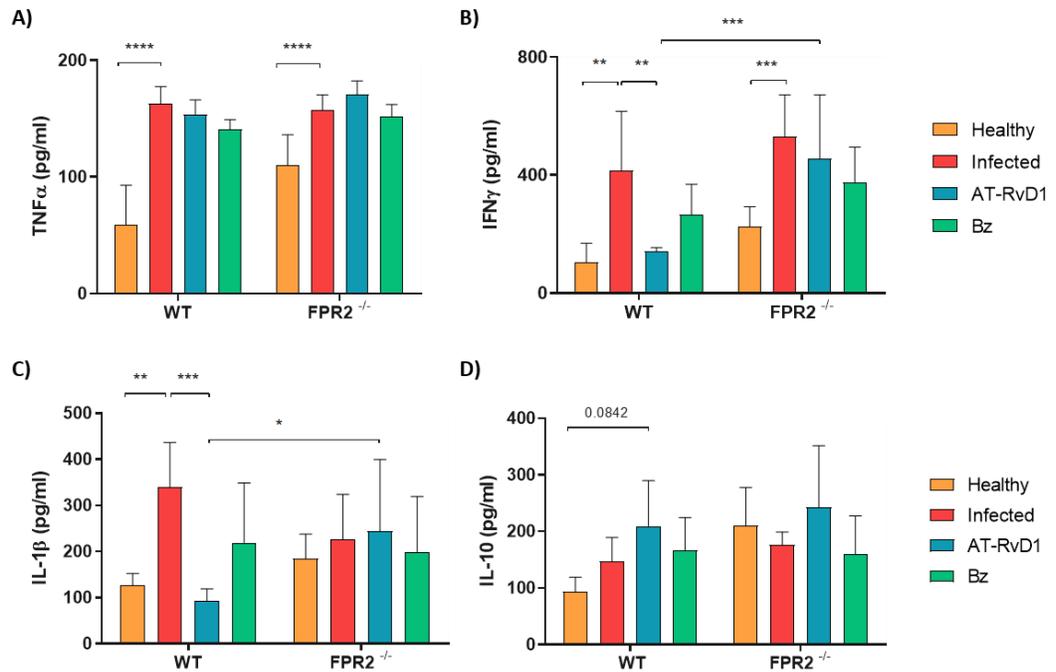


Figura 8. Niveles séricos de citoquinas en ratones infectados con *T. cruzi* y tratados con AT-RvD1 o benznidazol (Bz) (60 d.p.i). Las concentraciones de TNFα (A), IFNγ (B), IL-1β (C) e IL-10 (D) a nivel sérico se cuantificaron mediante ensayos de ELISA. Los datos se expresan como la media ± DS de cinco animales por grupo experimental. Se realizaron un ANOVA de dos vías seguido de un post-test de Tukey para identificar diferencias significativas. * p<0,05, ** p<0,01, *** p<0,001, **** p<0,0001

5.2.2 AT-RvD1 contrarresta el ambiente proinflamatorio a nivel cardíaco, reduce la expresión de IL-1β y TNFα e incrementa la expresión de IL-10.

Debido a que los niveles séricos de citoquinas reflejan un estado inflamatorio sistémico a raíz de la infección, fue necesario determinar qué ocurre a nivel cardíaco. Por lo tanto, se midió el efecto de AT-RvD1 sobre la respuesta inmune en el tejido cardíaco determinando los niveles relativos de RNA mensajero de citoquinas después de 20 días de tratamiento (60 d.p.i). En la Figura 9 se puede observar que los niveles de RNA mensajero de las citoquinas proinflamatorias TNFα (Figura 9A), IFNγ (Figura 9B) e IL-1β (Figura 9C) aumentaron en ratones WT y FPR2^{-/-} infectados. Mientras que, en ratones WT y FPR2^{-/-}, el tratamiento con AT-RvD1 previene el aumento de TNFα causado por la infección, pero no reduce significativamente IFNγ. Curiosamente, ratones WT y

FPR2^{-/-}, tratados con AT-RvD1 presentan un aumento significativo de los niveles de expresión de IL-10 (Figura 9D). Estos efectos son mediados parcialmente por FPR2, ya que en su ausencia aún se produce secreción de IL-10, pero en menor magnitud (p<0.01). Por último, en comparación con AT-RvD1, el tratamiento con benznidazol no modifica los niveles de RNA mensajero de las citoquinas estudiadas.

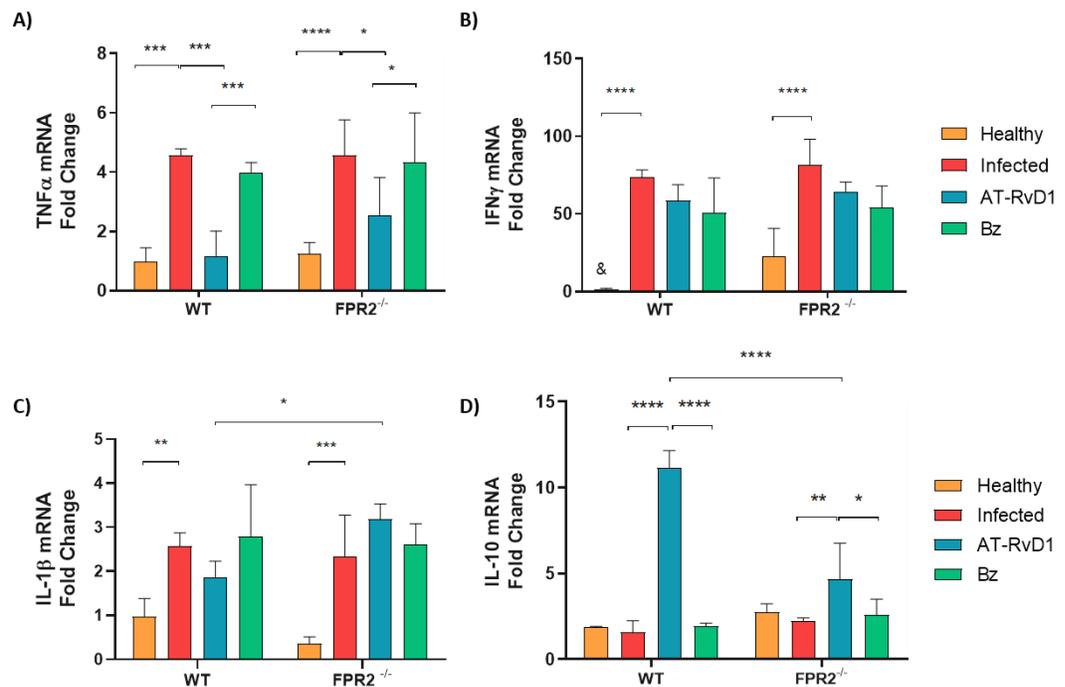
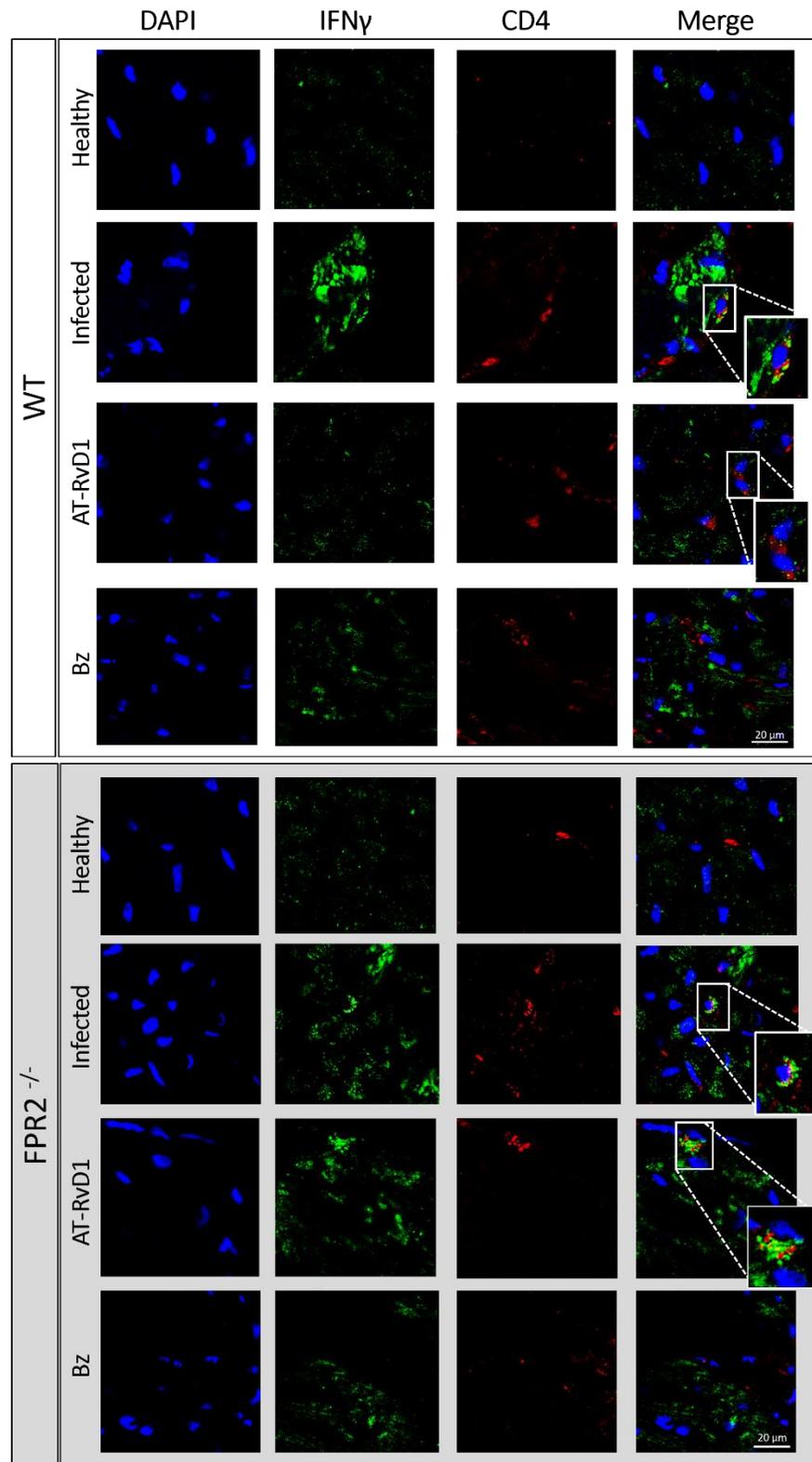


Figura 9. Niveles de RNA mensajero de citoquinas en tejido cardíaco de ratones infectados con *T. cruzi* y tratados con AT-RvD1 o benznidazol (Bz) (60 d.p.i). Niveles de RNA mensajero (mRNA) de TNF α (A), IFN γ (B), IL-1 β (C) e IL-10 (D) obtenidos a partir de tejido cardíaco de ratones C57BL/6 sanos, infectados con *T. cruzi* y tratados con AT-RvD1 o benznidazol, obtenido por RT-qPCR. Los datos se expresan como la media \pm DS de un experimento (n = 5). Se realizó un ANOVA de dos vías y una prueba posterior de Tukey para identificar diferencias significativas. * p<0,05, ** p<0,01, *** p<0,001, **** p<0,0001

Para determinar si el efecto de AT-RvD1 se debe a cambios en las poblaciones celulares que infiltran el tejido cardíaco, se realizó un ensayo de inmunofluorescencia dirigido a la identificación de células CD4⁺ productoras de IFN γ . Se observó, un incremento

significativo en la presencia de células CD4⁺ productoras de IFN γ en los infiltrados celulares, tanto en los ratones WT como FPR2^{-/-}. Tras el tratamiento con AT-RvD1, es posible notar que, en los ratones WT el infiltrado celular presentó una menor proporción de células CD4⁺ productoras de IFN γ . Este efecto podría estar mediado por el receptor FPR2, ya que, en su ausencia no varía significativamente la proporción de células CD4⁺ IFN γ ⁺ en los infiltrados celulares, con respecto a la infección. Por último, el tratamiento con benznidazol no redujo significativamente la presencia de células CD4⁺ IFN γ ⁺ en los infiltrados celulares presentes en el tejido cardíaco de los ratones WT y FPR2^{-/-}.

A)



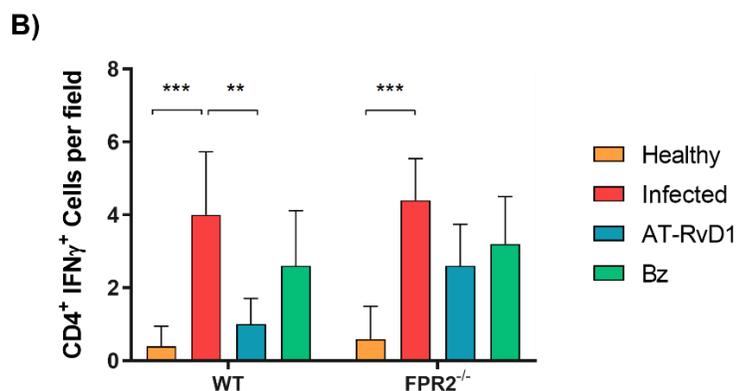
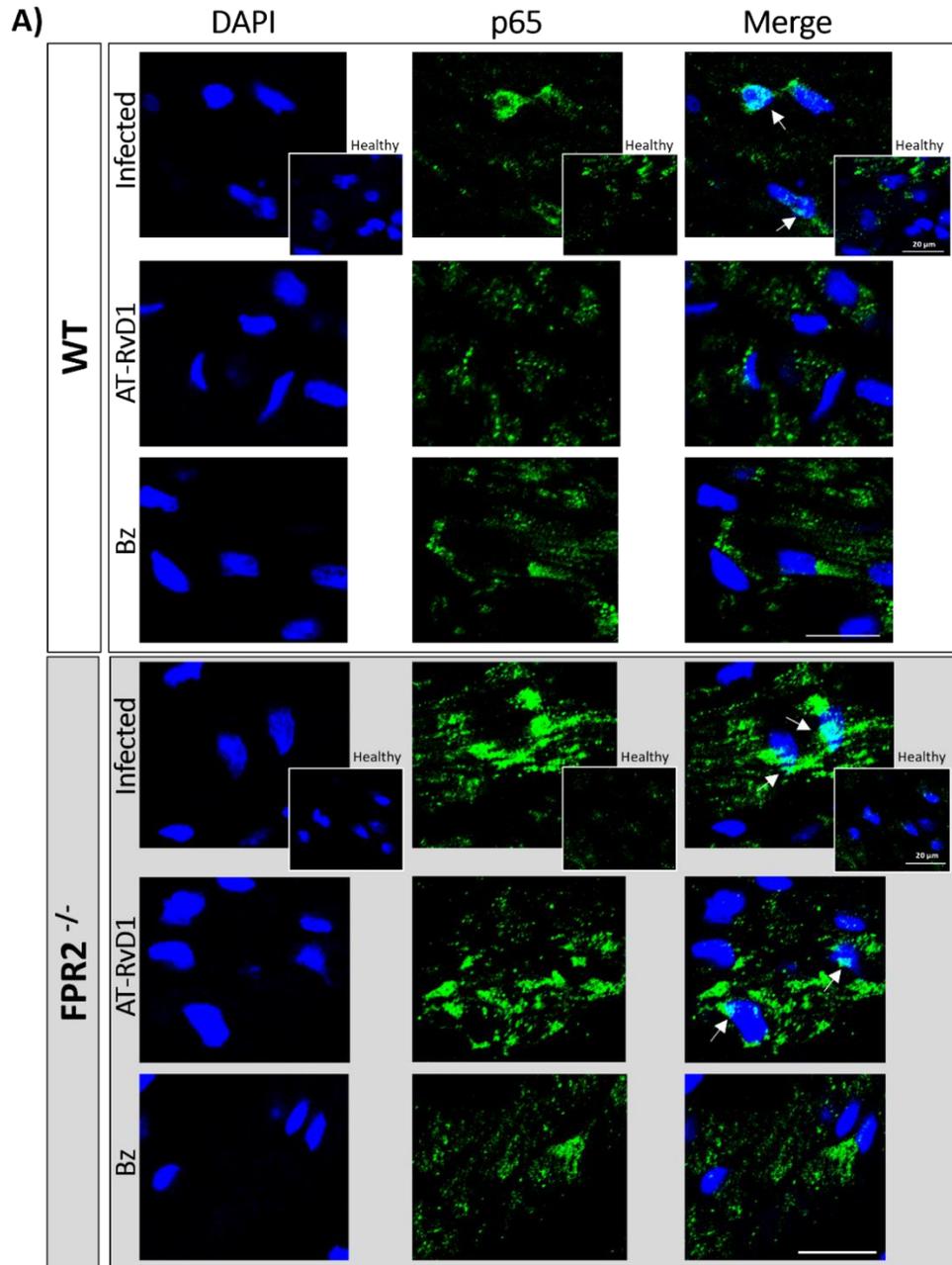


Figura 10. AT-RvD1 reduce la presencia de células CD4⁺ productoras de IFN γ en los infiltrados celulares del tejido cardíaco de ratones infectados crónicamente con *T. cruzi*. Ratones C57BL/6 WT y FPR2^{-/-} fueron infectados y tratados con AT-RvD1 o benznidazol durante 20 días (60 d.p.i). A) En cortes de tejido cardíaco se analizó la presencia de células CD4⁺ y la producción de IFN γ mediante la técnica inmunofluorescencia. En el panel se muestran imágenes representativas de tejido cardíaco con inmunotinción para IFN γ (verde), CD4 (rojo) y tinción nuclear (azul). Las ampliaciones muestran células CD4⁺ productoras de IFN γ . Las imágenes son representativas de un experimento de 5 animales por grupo experimental. B) Número de células CD4⁺ productoras de IFN γ ⁺ (CD4⁺ IFN γ ⁺) por campo. Los datos se expresan como la media \pm DS de cinco animales por grupo experimental. Se realizó un ANOVA de dos vías y una prueba posterior de Tukey para identificar diferencias significativas. ** $p \leq 0,01$; *** $p \leq 0,001$. Barra de escala = 20 μ m.

5.2.3 AT-RvD1 reduce la translocalización nuclear de p65 en el tejido cardíaco de ratones C57BL/6 crónicamente infectados con *T. cruzi*, por acción sobre FPR2.

Las propiedades antiinflamatorias y proresolutivas de AT-RvD1 se han explicado por la inhibición de la vía de señalización NF κ B (Lee et al., 2013; Gao et al., 2017), por lo que se evaluó mediante inmunofluorescencia y microscopía confocal la translocación nuclear de p65 como marcador de activación de esta vía (Figura 11). De acuerdo con un estado inflamatorio crónico, los ratones WT y FPR2^{-/-} infectados mostraron un incremento en el porcentaje de localización nuclear de p65 en el tejido cardíaco. El tratamiento con AT-RvD1 redujo el porcentaje de localización nuclear de p65 en los ratones WT. AT-RvD1 previene la translocación nuclear de p65, comprobando que la acción antiinflamatoria vía NF κ B en este modelo esta mediada por FPR2. De la misma manera, el tratamiento con

benznidazol redujo significativamente el número de núcleos p65⁺ en los ratones WT (Figura 11B).



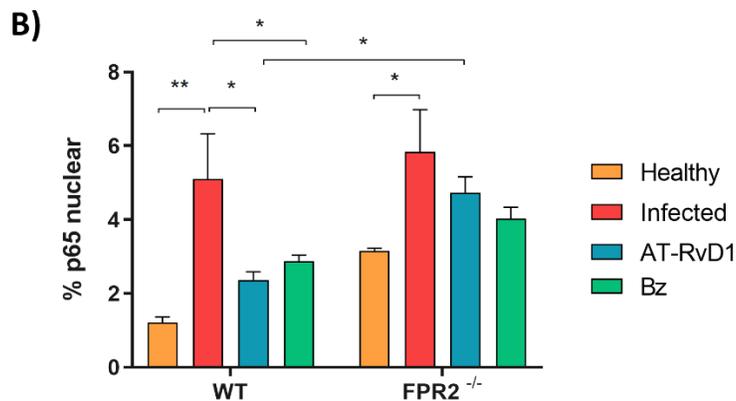


Figura 11. Localización nuclear de p65 en tejido cardíaco de ratones infectados con *T. cruzi* (60 d.p.i) y tratados con AT-RvD1 o benznidazol (Bz) por 20 días. A) Se muestran imágenes representativas de tejido cardíaco con inmunotinción para p65 (verde) y tinción nuclear (azul). Las flechas blancas señalan colocalización de p65 a nivel nuclear. B) Porcentaje del número de núcleos que muestran colocalización con p65. Los datos se expresan como la media \pm DS de cinco animales por grupo experimental. Se realizó un ANOVA de dos vías y una prueba posterior de Tukey para identificar diferencias significativas. * $p \leq 0,05$, ** $p \leq 0,01$. Barra de escala = 20 μ m.

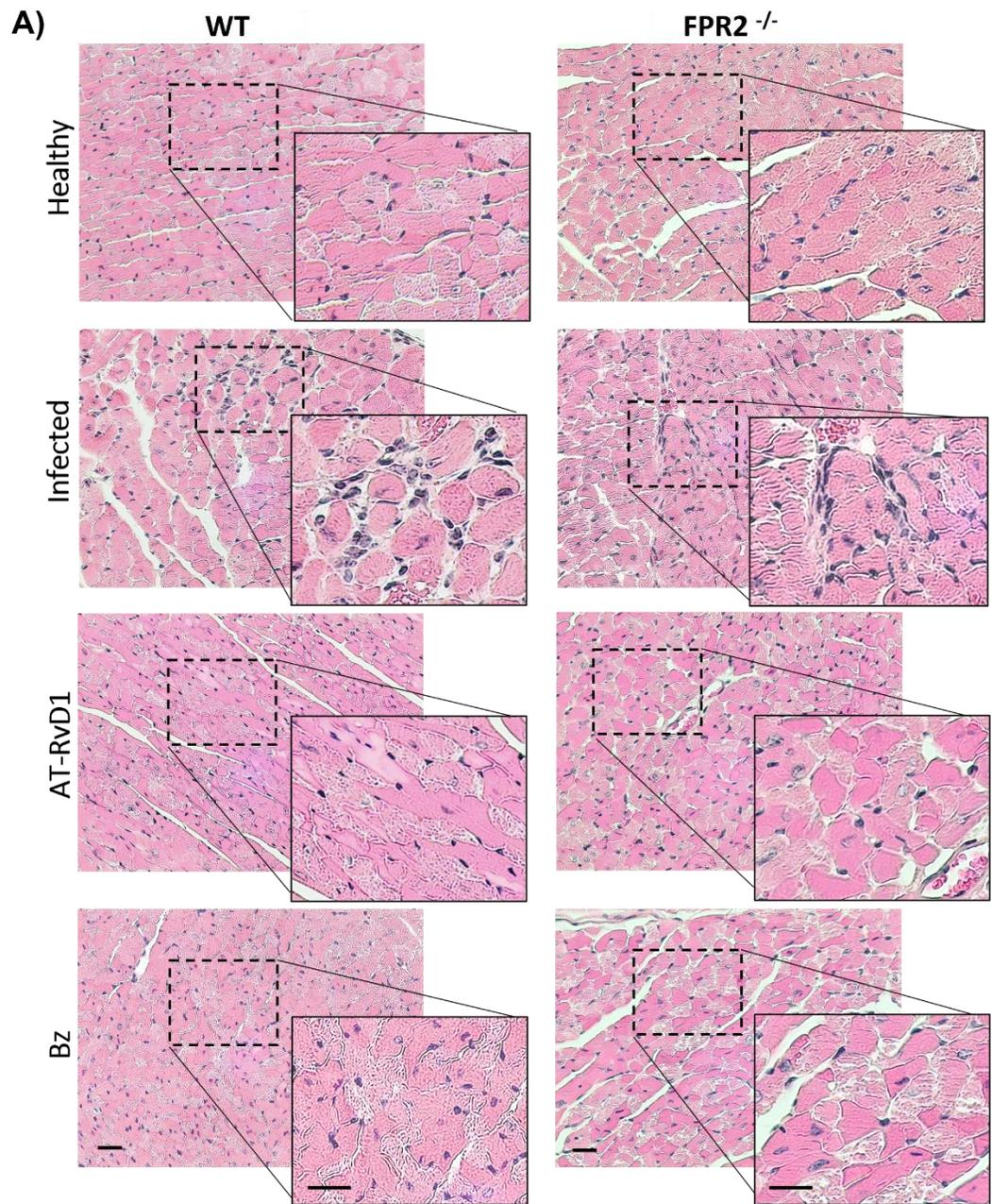
5.3 EL TRATAMIENTO CON AT-RVD1, MEDIANTE EL RECEPTOR FPR2, REDUCE EL INFILTRADO INFLAMATORIO, HIPERTROFIA Y FIBROSIS DEL TEJIDO CARDIACO, EN EL MODELO MURINO DE CCC.

5.3.1 AT-RvD1 reduce el infiltrado inflamatorio en el tejido cardíaco de los ratones infectados con *T. cruzi*, mediante el receptor FPR2.

En la CCC, la inflamación crónica es un factor determinante en el deterioro de la arquitectura cardíaca. Por esto, se cuantificó la celularidad en secciones de tejido cardíaco para evaluar el efecto de AT-RvD1 sobre el infiltrado celular. Para ello, se realizó un análisis histológico con hematoxilina-eosina y se cuantificaron los núcleos celulares en relación con el área de tejido (Figura 12A). Los ratones WT y FPR2^{-/-} infectados con *T. cruzi* al día 60 p.i. mostraron infiltrados inflamatorios focales y una mayor celularidad en el tejido cardíaco y como resultado del tratamiento con AT-RvD1, se redujo significativamente el infiltrado celular en el tejido (Figura 12B). La ausencia del receptor FPR2 perjudicó la reducción del infiltrado celular, lo que sugiere a este receptor como

mediador de este efecto. Además, el efecto de AT-RvD1 en la reducción del infiltrado inflamatorio fue más significativo que el obtenido con benznidazol por sí solo.

Estas observaciones se confirman al determinar los niveles de RNA mensajero correspondiente a VCAM e ICAM, moléculas de adhesión celular que facilitan la migración transendotelial y el infiltrado celular (Figura 12C-D, respectivamente). Como resultado, VCAM e ICAM aumentan significativamente en ratones WT y FPR2^{-/-} infectados (60 d.p.i.) y en concordancia con el análisis de celularidad, el tratamiento con AT-RvD1 redujo significativamente ambos marcadores moleculares en los ratones WT. Sin embargo, la actividad del receptor es responsable del efecto sobre VCAM, no así sobre ICAM, ya que en ausencia de FPR2, AT-RvD1 no reduce la expresión génica de VCAM, pero sí de ICAM, sugiriendo la participación de vías alternativas en la mediación de este efecto. Por otro lado, el tratamiento con benznidazol no modificó los niveles de RNA mensajero de estos marcadores de activación endotelial.



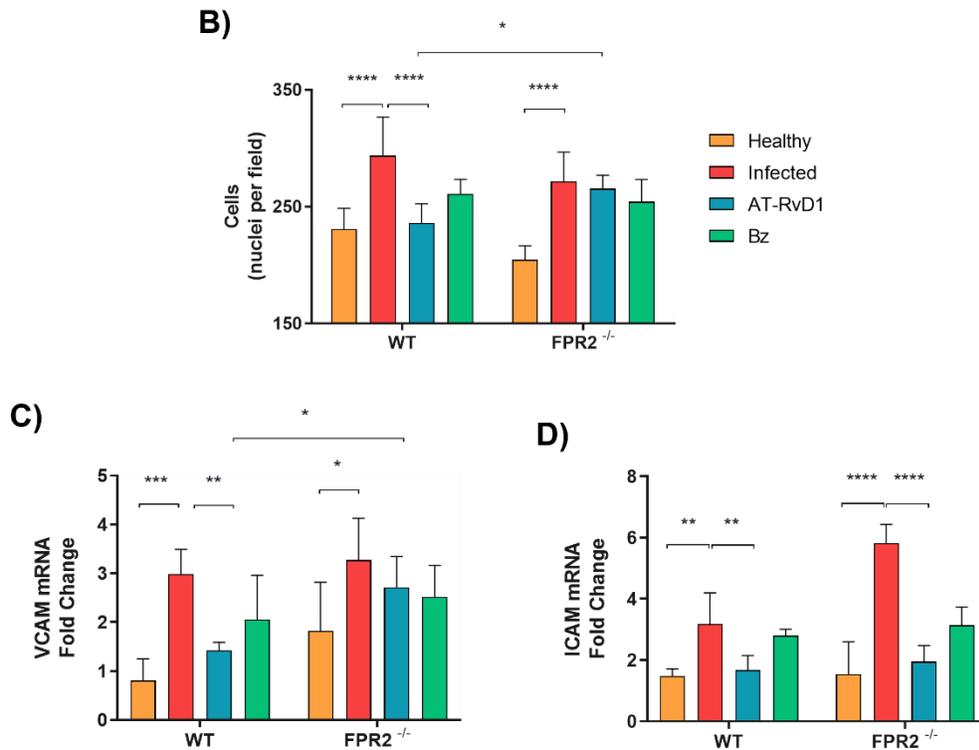
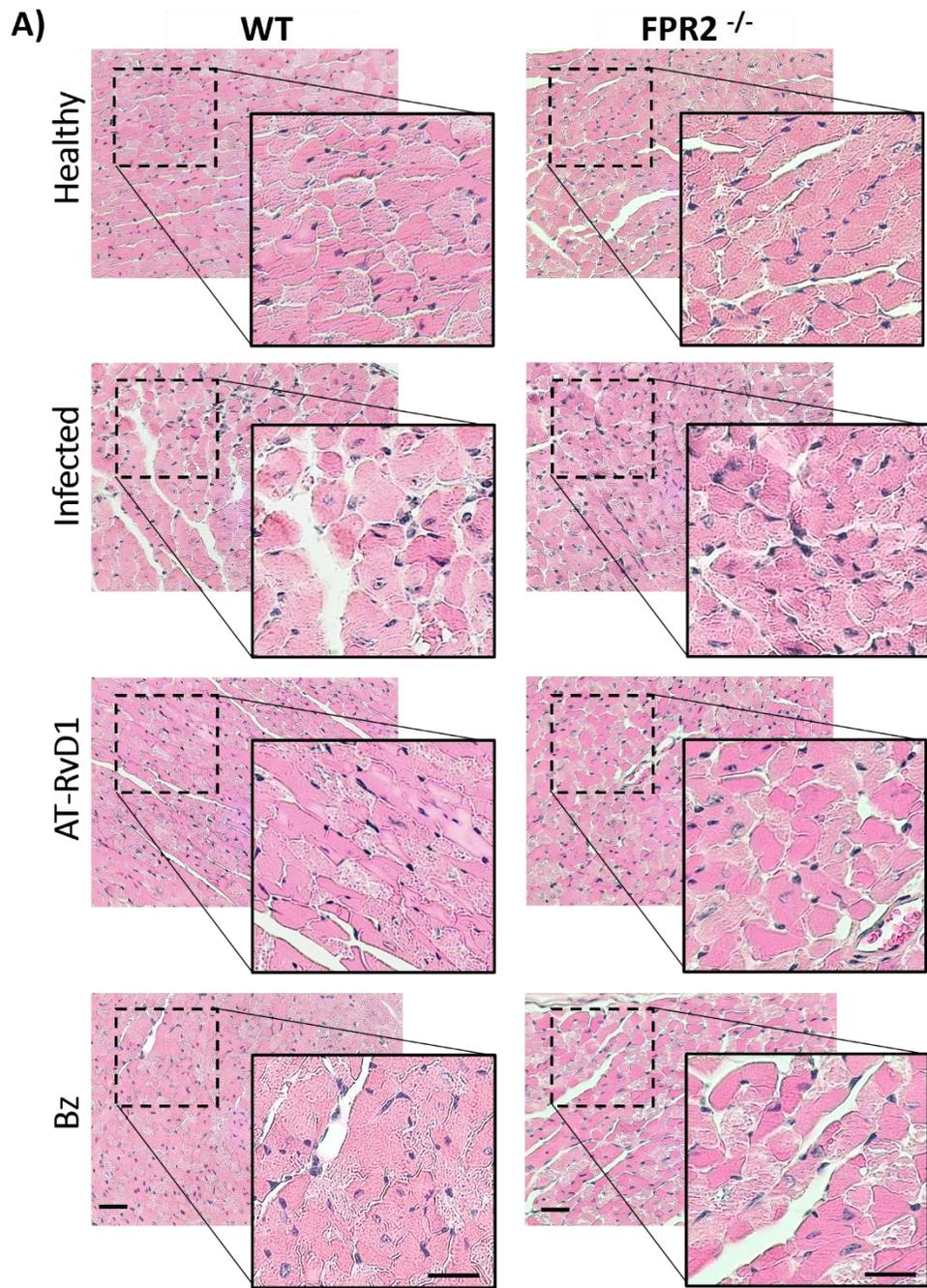


Figura 12. AT-RvD1 reduce el infiltrado celular en el tejido cardíaco de ratones C57BL/6 infectados crónicamente con *T. cruzi*. A) Imágenes representativas de tejido cardíaco teñidas con hematoxilina-eosina de ratones C57BL/6 infectados con *T. cruzi* y tratados con AT-RvD1 o benznidazol a las dosis indicadas. Las ampliaciones destacan la celularidad en cada grupo experimental. B) Análisis cuantitativo de celularidad en tejidos cardíacos de cinco campos por animal. C-D) Niveles de RNA mensajero (mRNA), determinados por RT-qPCR, de las moléculas de adhesión celular VCAM e ICAM, en tejido cardíaco de ratones C57BL/6 infectados con *T. cruzi* y tratados con AT-RvD1 o benznidazol (Bz). Los datos se expresan como la media \pm DS de cinco animales por grupo experimental. Se realizó un ANOVA de dos vías, seguido del post-test de Tukey para identificar diferencias significativas. * $p \leq 0,05$, ** $p \leq 0,01$, *** $p \leq 0,001$, **** $p \leq 0,0001$. Barra de escala = 20 μ m.

5.3.2 AT-RvD1 previene la hipertrofia cardíaca en el modelo murino de CCC.

Debido a que la hipertrofia y la disfunción cardíaca son complicaciones significativas de la EC crónica, el efecto de AT-RvD1 sobre la hipertrofia cardíaca se evaluó midiendo el área transversal de cardiomiocitos en las secciones de tejido cardíaco mostradas en la

figura 12A y que corresponden a los recuadros mostrados en la figura 13A. La infección con *T. cruzi* aumentó el área transversal de las fibras musculares cardíacas en ratones WT y FPR2^{-/-} a los 60 d.p.i., lo que demuestra cambios estructurales en el corazón desde el inicio de la fase crónica. Sin embargo, AT-RvD1 redujo significativamente el área de la sección transversal de los cardiomiocitos, un efecto dependiente del receptor FPR2, ya que, en los ratones FPR2^{-/-} no hubo reducción en la hipertrofia cardíaca (Figura 13B). Esto sugiere que la terapia con AT-RvD1 puede reducir la hipertrofia cardíaca, a diferencia de benznidazol que, por sí solo, no reduce la hipertrofia. Estas observaciones se apoyaron midiendo los niveles de RNA mensajero de péptido natriurético auricular (ANP) y péptido natriurético cerebral (BNP), marcadores moleculares de hipertrofia cardíaca (Sergeeva & Christoffels, 2013) (Figura 13C-D, respectivamente). Tanto el ANP como el BNP aumentaron significativamente en ratones WT y FPR2^{-/-} infectados (60 d.p.i.). De acuerdo con los análisis histológicos, el tratamiento con AT-RvD1 redujo significativamente ambos marcadores moleculares de hipertrofia cardíaca, acción que ocurre por mediación de FPR2, pues en los ratones FPR2^{-/-} no provocó cambios significativos en estos parámetros. Por otro lado, el tratamiento con benznidazol no modificó estos marcadores moleculares de hipertrofia, confirmando la ausencia de efecto del benznidazol sobre la hipertrofia cardíaca.



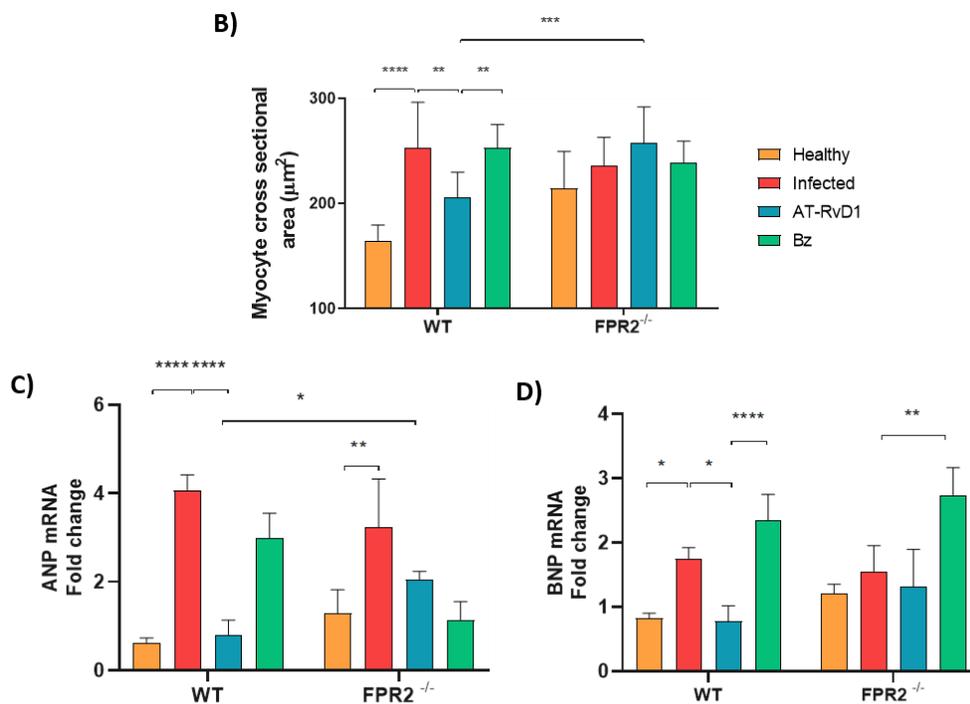
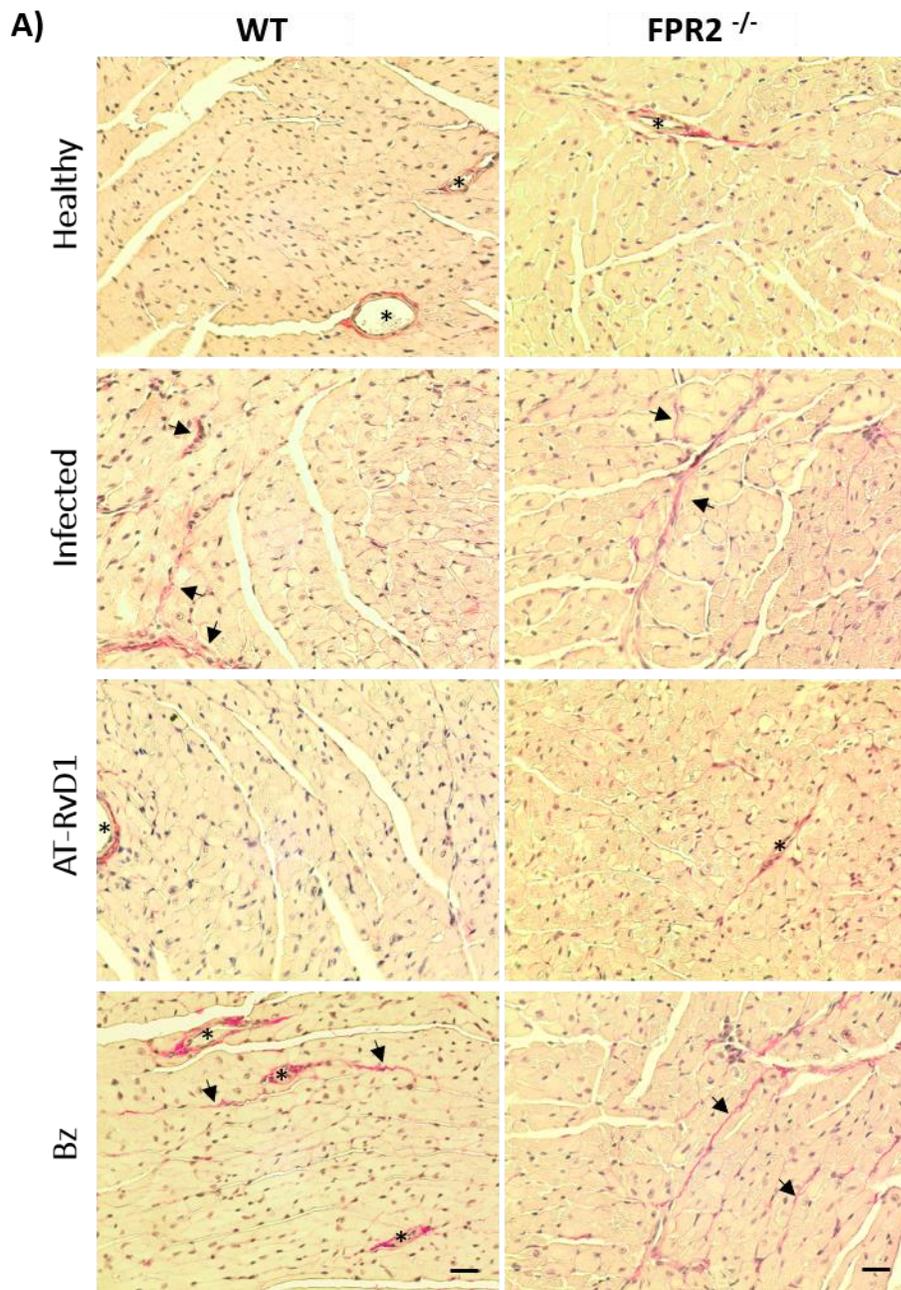


Figura 13. AT-RvD1 reduce la hipertrofia cardíaca en C57BL/6 infectados crónicamente con *T. cruzi*. A) Imágenes representativas de tejido cardíaco teñidas con hematoxilina-eosina de ratones C57BL/6 infectados con *T. cruzi* y tratados con AT-RvD1 o benznidazol a las dosis indicadas. En las ampliaciones se destaca el área de los cardiomiocitos. B) Análisis del área de sección transversal de cardiomiocitos, se eligieron al azar 200 cardiomiocitos por animal. C-D) Niveles de RNA mensajero (mRNA) de péptido natriurético auricular (ANP) y péptido natriurético cerebral (BNP), como marcadores de hipertrofia medidos en tejido cardíaco de ratones C57BL/6 no infectados infectados con *T. cruzi* y tratados con AT-RvD1 o benznidazol (Bz), mediante ensayos de RT-qPCR. Los datos se expresan como la media \pm DS de cinco animales por grupo experimental. Se realizó un ANOVA de dos vías, seguido de un post-test de Tukey para identificar diferencias significativas. * $p \leq 0,05$, ** $p \leq 0,01$, *** $p \leq 0,001$, **** $p \leq 0,0001$. Barra de escala = 20µm.

5.3.3 AT-RvD1 previene la fibrosis cardíaca en el modelo murino de CCC.

Aunque la hipertrofia cardíaca en la EC crónica es un sello distintivo de la remodelación cardíaca, la fibrosis implica un daño estructural más profundo y permanente. Por tanto, se analizó el efecto de AT-RvD1 sobre la fibrosis cardíaca en nuestro modelo de CCC. En la Figura 14A se puede visualizar secciones de tejido cardíaco que fueron teñidas con Rojo

Picro-Sirio para identificar las fibras de colágeno (Figura 14A). En consecuencia, con la progresión de la EC, la fibrosis cardíaca aumentó en ratones infectados WT y FPR2^{-/-}, a los 60 d.p.i., y el tratamiento con AT-RvD1 redujo significativamente la fibrosis cardíaca, incluso, de manera más eficiente que el benznidazol, tanto en ratones WT como FPR2^{-/-} (Figura 14B). Estos análisis fueron confirmados midiendo los niveles de RNA mensajero de alfa actina de musculo liso (α SMA) como marcador molecular de miofibroblastos, células responsables de los procesos fibróticos (Figura 14C). Se observó que los ratones WT y FPR2^{-/-} infectados presentaron un incremento significativo en los niveles de RNA mensajero de α SMA. Consistentemente con el análisis histológico, AT-RvD1 tiende a reducir los niveles de α SMA en los ratones WT y los reduce significativamente en los ratones FPR2^{-/-}, sugiriendo que este efecto es independiente de FPR2. Con respecto al tratamiento con benznidazol, no modificó los niveles del marcador de miofibroblastos α SMA.



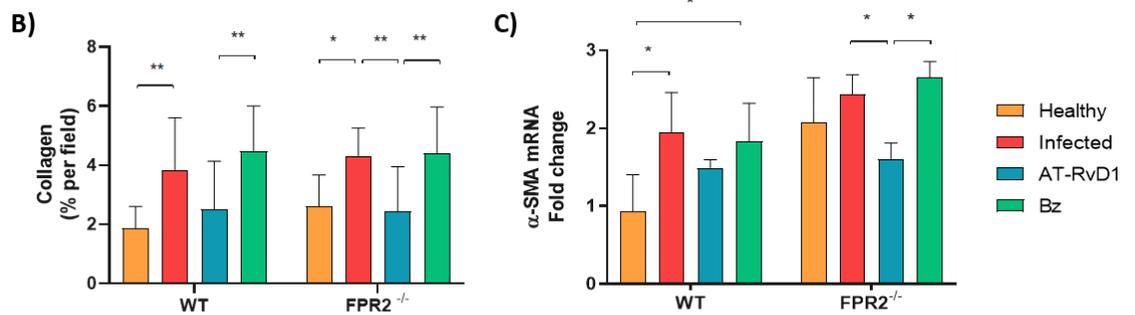


Figura 14. AT-RvD1 reduce la fibrosis cardíaca en ratones C57BL/6 infectados crónicamente con *T. cruzi*. A) Imágenes representativas de tejido cardíaco teñido con rojo Picro-sirius de ratones C57BL/6 infectados con *T. cruzi* (Dm28c) y tratados con AT-RvD1 o benznidazol (Bz) a las dosis indicadas. Los asteriscos muestran vasos sanguíneos como referencia para la tinción de colágeno. Las flechas negras indican depósitos de colágeno. B) Análisis cuantitativo de los píxeles rojos en tejido cardíaco, correspondiente a fibrosis, de cinco campos por animal. C) Niveles de RNA mensajero (mRNA) de alfa actina de musculo liso (α SMA) como marcador de miofibroblastos, medido en tejido cardíaco de ratones C57BL/6 no infectados con *T. cruzi* y tratados con AT-RvD1 o benznidazol (Bz), mediante ensayos de RT-qPCR. Los datos se expresan como la media \pm DS de cinco animales por grupo experimental. Se realizó un ANOVA de dos vías, seguido de un post-test de Tukey para identificar diferencias significativas. * $p \leq 0,05$, *** $p \leq 0,001$. Barra de escala = 20 μ m.

5.4 DETERMINACIÓN DEL EFECTO DE AT-RVD1 SOBRE LA ACTIVIDAD ELÉCTRICA CARDÍACA EN RATONES INFECTADOS CON *T. cruzi*.

5.4.1 Alteraciones electrocardiográficas en ratones C57BL/6 WT y FPR2^{-/-} infectados con *T. cruzi*.

Durante la EC crónica, los signos de remodelado cardíaco incluyen trastornos de la conducción auriculo-ventricular e intraventricular como bloqueo de la rama derecha (Haz de His), cambios en el intervalo QT, y trastornos de frecuencia cardíaca como bradicardia sinusal (Echeverria et al., 2019). Por ello, se comparó la actividad electrocardiográfica de los corazones C57BL/6 WT y FPR2^{-/-} infectados con *T. cruzi*, evaluando los siguientes parámetros: frecuencia cardíaca (FC), onda P, Intervalo PR, Complejo QRS, Intervalo QT y QTc, a los días 25, 40 y 60 p.i. (Figura 15).

En los ratones WT infectados, se presentó un incremento de la frecuencia cardíaca a los 25 d.p.i. Sin embargo, a los 60 d.p.i., se observó una reducción significativa de la frecuencia cardíaca en comparación con su control sano (Figura 15A).

La onda P representa la despolarización auricular y el intervalo PR corresponde al tiempo que existe entre el inicio de la despolarización auricular hasta el inicio de la despolarización del ventrículo, por lo que, los cambios en estos parámetros indican alteraciones en la conducción auricular y/o auriculo-ventricular (Kaplan et al., 2018). En nuestro modelo, en los ratones WT infectados, se apreció un leve incremento en la duración de la onda P a los 60 d.p.i, reflejando un ligero, aunque significativo, enlentecimiento en la conducción eléctrica auricular (Figura 15B).

Adicionalmente, los parámetros que permiten evaluar la conducción ventricular son el complejo QRS, el intervalo QT y el QT corregido (QTc). El complejo QRS corresponde al tiempo que demora en producirse la despolarización ventricular, y el intervalo QT da cuenta del tiempo transcurrido entre la despolarización y la repolarización ventricular. El valor QTc corresponde al intervalo QT, pero corregido matemáticamente con la frecuencia cardíaca, lo que facilita la comparación entre individuos (Kaplan et al., 2018). En nuestro modelo, los ratones WT infectados (Figura 15D-F) presentan un incremento significativo en la duración del intervalo QT y QTc, correspondiente a un enlentecimiento en la despolarización y repolarización ventricular, característicos de la fase crónica temprana de la EC crónica (Salles et al., 2003).

En el caso de los ratones FPR2^{-/-}, las alteraciones electrocardiográficas se presentaron únicamente en la fase aguda de la infección (25 d.p.i), donde se observó un incremento significativo de la frecuencia cardíaca con respecto del control sano (Figura 15A), además de una conducción auriculo-ventricular enlentecida, evidenciada por un incremento en la duración de la onda P y el intervalo PR (Figura 15B-C), sin alteraciones evidentes a nivel ventricular (Figura 15D-F). Estas alteraciones se reducen finalizada la fase aguda, ya que, a los 40 y 60 d.p.i, no presentan diferencias significativas con respecto a su control sano.

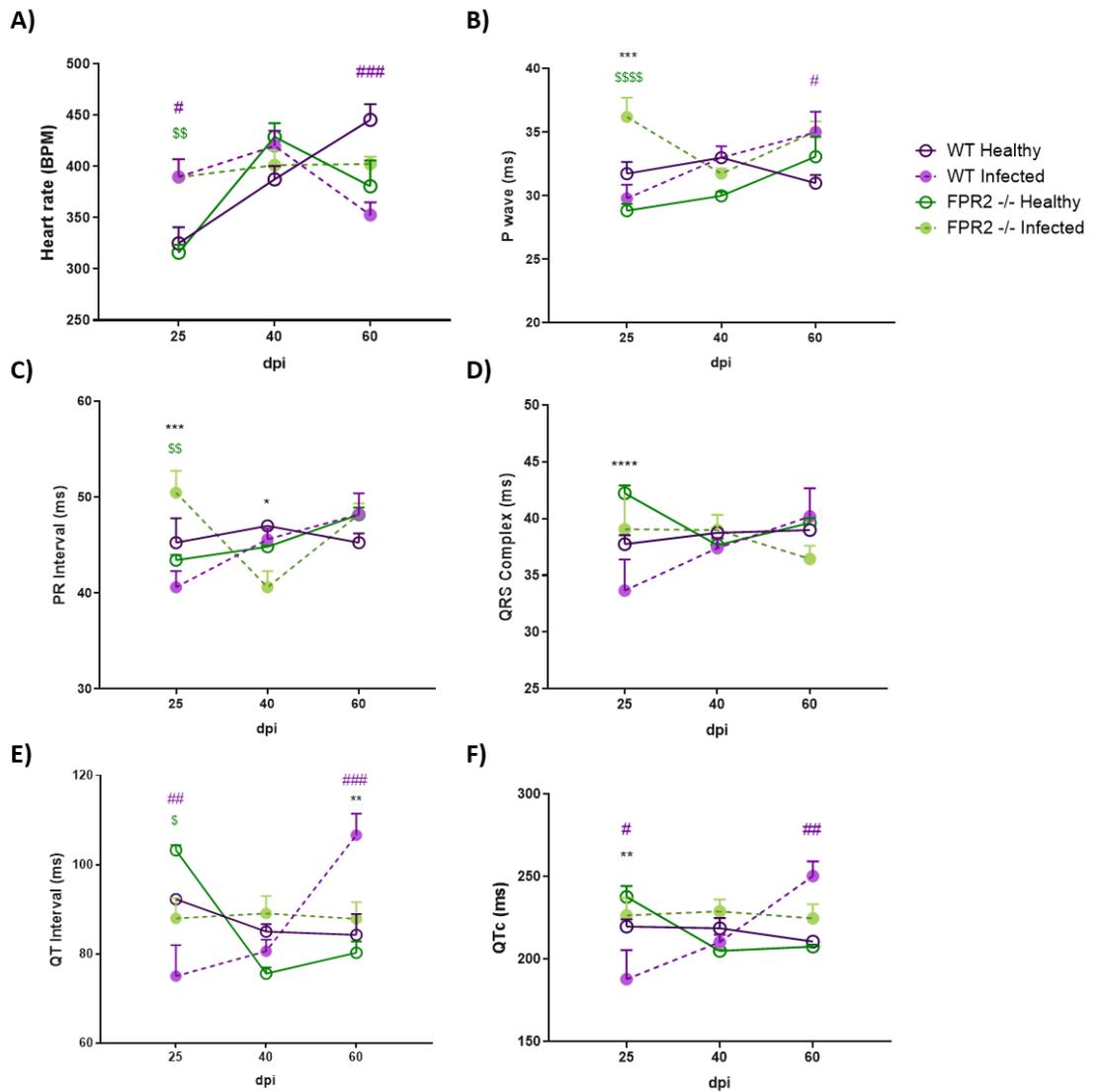


Figura 15. Cambios electrocardiográficos a los 25, 40 y 60 días postinfección en ratones C57BL/6 WT y FPR2^{-/-} infectados con *T. cruzi* (cepa Dm28c). Se presenta la variación en frecuencia cardíaca (A), onda P (B), intervalo PR (C), complejo QRS (D), intervalo QT (E), QTc (F) durante los 60 d.p.i del estudio. Los datos se expresan como la media ± DS de cinco animales. El análisis estadístico utilizado fue ANOVA de dos vías seguido de una prueba posterior de Tukey. * indican diferencias significativas entre WT sano y WT infectado. \$ indican diferencias significativas entre FPR2^{-/-} sano y FPR2^{-/-} infectado. * p≤0,05, ** p≤0,01, *** p≤0,001, **** p≤0,0001

5.4.2 AT-RvD1, y en mayor grado benznidazol, previenen las alteraciones electrocardiográficas en el modelo murino de EC crónica.

Considerando que la infección por *T. cruzi* provoca disminución de la frecuencia cardíaca, enlentecimiento de la conducción auriculo-ventricular y altera la repolarización ventricular, se procedió a analizar el efecto de AT-RvD1 sobre estos cambios electrocardiográficos (Figura 16).

Así, el tratamiento con AT-RvD1 mostró una tendencia a recuperar la frecuencia cardíaca; sin embargo, solo los ratones tratados con benznidazol presentaron una frecuencia cardíaca similar al control sano y significativamente diferente a los ratones WT infectados (Figura 16A). En el caso de los ratones FPR2^{-/-}, no se observaron diferencias importantes entre el control y los distintos tratamientos.

Con respecto a la conducción eléctrica auricular (Figura 16B-C), los ratones tratados con AT-RvD1 o benznidazol no mostraron diferencias significativas con los ratones infectados WT y FPR2^{-/-}.

Finalmente, al evaluar la conducción eléctrica ventricular (Figura 16D-F), se observó una reducción significativa en la duración del intervalo QT y QTc, en los ratones WT tratados con AT-RvD1; sin embargo, el tratamiento con benznidazol fue más eficaz en reducir estos parámetros, logrando producir valores similares al grupo sano. En el caso de los ratones FPR2^{-/-}, no se observaron diferencias significativas entre el control y los distintos tratamientos.

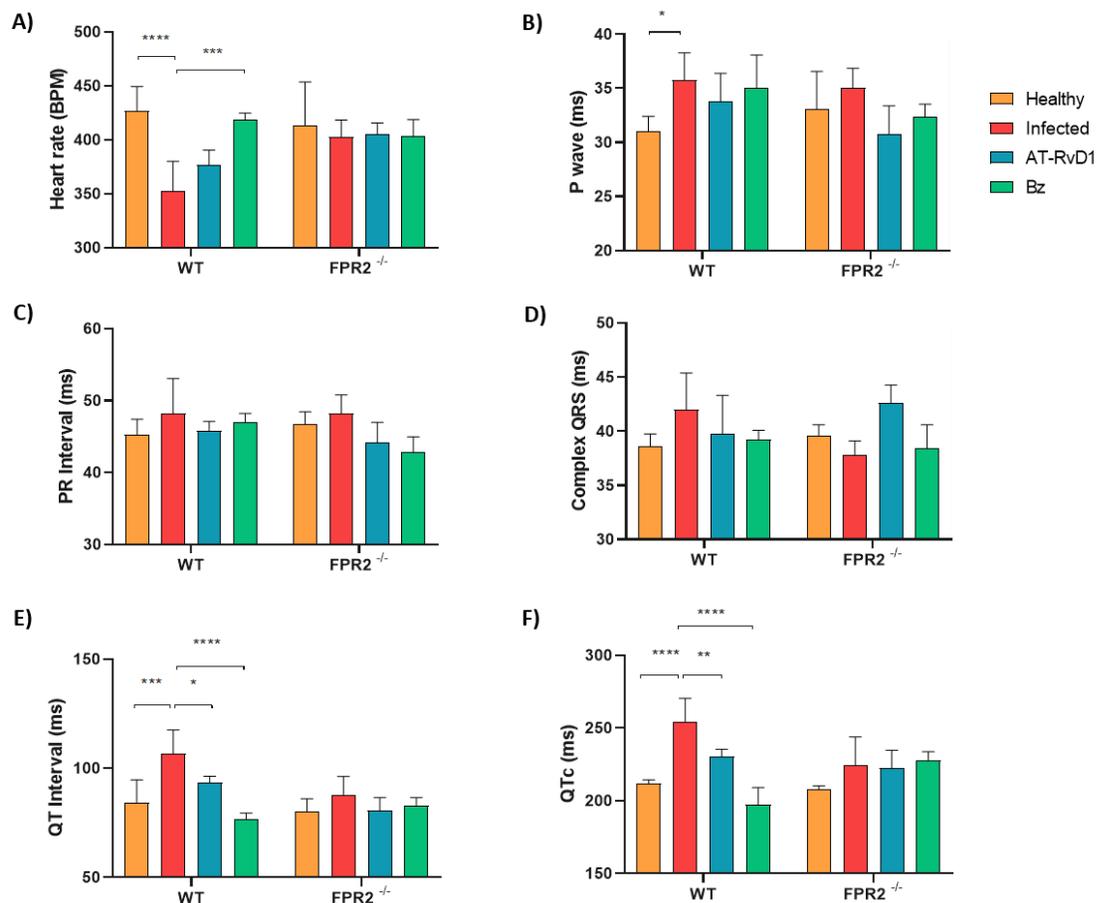


Figura 16. Efecto de AT-RvD1 y benznidazol (Bz) en ratones C57BL/6 WT y FPR2^{-/-} infectados con *T. cruzi* sobre el sistema de conducción eléctrica cardíaca. Se analizó la variación en frecuencia cardíaca (A), onda P (B), intervalo PR (C), Complejo QRS (D), intervalo QT (E), QTc (F). Los datos se expresan como la media ± DS de cinco animales por grupo experimental. El análisis estadístico utilizado fue ANOVA de dos vías seguido de una prueba posterior de Tukey. ** p<0,01, *** p<0,001, **** p<0,0001

5.4.3 Efecto de AT-RvD1 sobre la carga parasitaria en el corazón de ratones C57BL/6 WT y FPR2^{-/-} infectados con *T. cruzi*.

La presencia del parásito es el principal determinante de los procesos inflamatorios que finalmente conllevan a los daños estructurales irreversibles en el corazón. Para evaluar el efecto de AT-RvD1 sobre la persistencia del parásito en el tejido cardíaco y correlacionarla con los hallazgos previamente descritos, se determinó la carga parasitaria

en el tejido cardíaco. Para ello, se amplificó el RNA ribosomal 18S de *T. cruzi* mediante RT-qPCR, para cuantificar el número de parásitos en el tejido cardíaco al final de los tratamientos. Como se esperaba, benznidazol redujo la carga cardíaca de *T. cruzi* a niveles indetectables en ambos modelos animales (Figura 17). Sin embargo, y de manera inesperada, ya que AT-RvD1 no tiene propiedades tripanocidas, AT-RvD1 disminuyó la carga cardíaca de *T. cruzi* en ratones WT y *FPR2*^{-/-}, aunque en este último grupo la disminución de la carga parasitaria fue menos marcada.

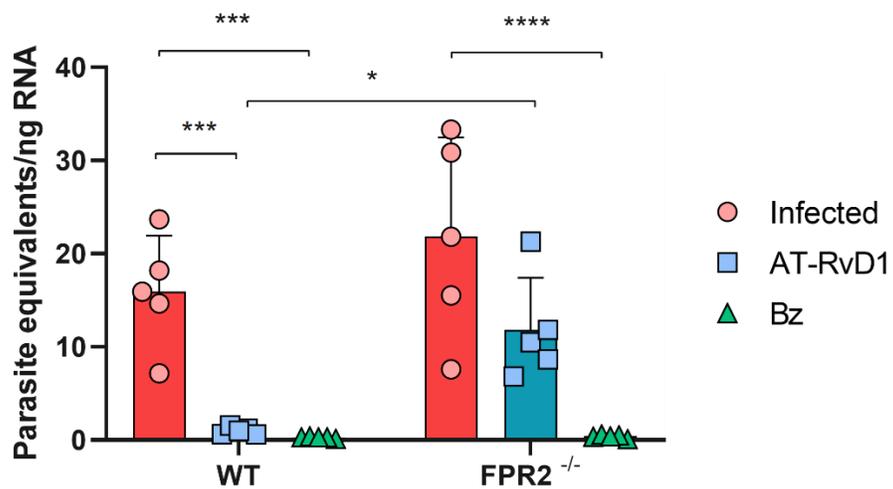


Figura 17. Carga de parásitos en tejido cardíaco de ratones infectados crónicamente con *T. cruzi* y tratados con AT-RvD1 o benznidazol (Bz) a los 60 d.p.i. El RNA ribosomal 18S de *T. cruzi* se detectó mediante RT-qPCR. Los datos se expresan como la media ± DS de cinco animales por grupo experimental. Se realizó un ANOVA bidireccional y una prueba posterior de Tukey para identificar diferencias significativas. *** $p \leq 0,001$, **** $p \leq 0,0001$.

6. DISCUSION

6.1 Consecuencias de la ausencia del receptor FPR2 durante la infección con *T. cruzi*.

Consistente con el modelo experimental utilizado, el curso de la parasitemia en los ratones WT como en los FPR2^{-/-} fue el esperado para la cepa Dm28c de *T. cruzi* (Molina-Berrios et al., 2013a; Molina-Berrios et al., 2013b). Aunque no hubo diferencia significativa durante la cinética de la parasitemia entre los ratones WT y FPR2^{-/-}, otros estudios si dan cuenta de diferencias en la evolución de las parasitemias, como en ausencia de la actividad de 5-lipoxigenasa o como en el caso de los ratones FPR2^{-/-}, donde la biosíntesis o acción de los SPMs esta disminuida. Estos reportes son consistentes con otros modelos experimentales donde la delección de 5-lipoxigenasa (5-LO), también desarrolla una parasitemia reducida (González-Herrera et al., 2017; das Dores et al., 2021). Esta disminución de la parasitemia observada en los ratones FPR2^{-/-} sugiere que, la ausencia de uno o más elementos proresolutivos de la inflamación permite un mejor control del parásito durante la fase aguda de la enfermedad, debido a una menor contención de la respuesta inflamatoria y una mayor capacidad de los macrófagos para eliminar los parásitos. Recientemente, das Dores y cols han colocado a FPR2 sobre la palestra, como un potencial blanco farmacológico en la infección con *T. cruzi*, ya que la ausencia de FPR2 en macrófagos potencia su actividad tripanocida, al reducir la tasa de replicación del parásito y con ello una reducida liberación de tripomastigotes (das Dores et al., 2021). En nuestro estudio, específicamente, la parasitemia en los ratones FPR2^{-/-} se redujo después de tres semanas p.i., el momento en que se establece una respuesta adaptativa específica al antígeno con la participación de linfocitos T citotóxicos, T *helper* y linfocitos B (Cardillo et al., 2015). Estas respuestas podrían, tal vez, ser más eficientes en los ratones FPR2^{-/-}, lo cual sería interesante evaluar en futuras investigaciones.

El linaje de ratón C57BL/6 es considerado como resistente a la infección por *T. cruzi* en comparación con otros linajes murinos (Ferreira et al., 2018), lo que explica que la sobrevivencia de los ratones WT y FPR2^{-/-} fuera tan alta; además, la eliminación del receptor FPR2 no es esencial para la supervivencia de los animales, ni menos en el contexto de la infección con el tripanosoma. Curiosamente, los ratones FPR2^{-/-} sanos presentaron niveles basales elevados de IL-10, lo que podría estar relacionado con un menor riesgo de

mortalidad durante la fase aguda de la infección, pues la neutralización de IL-10 o su ausencia en ratones infectados reduce la tasa de supervivencia como consecuencia de una miocarditis fatal (Roffê et al., 2012). Por lo tanto, el equilibrio antiinflamatorio mediado por IL-10 juega un papel fundamental en la supervivencia y el control de las respuestas inflamatorias deletéreas, probablemente mediadas por las funciones de las células T reguladoras (Treg) (Tonelli et al., 2011; Esper et al., 2012; Acevedo et al., 2018).

La transición de la fase aguda a la crónica se acompaña de una disminución del parasitismo tisular y parasitemia, así como también, del control de la respuesta inflamatoria (Dutra et al., 2014), lo cual se observó en nuestro modelo experimental al día 40 p.i.

En cuanto al rol del FPR2, se ha reportado que, en situaciones de enfermedades infecciosas bacterianas su activación aumenta la supervivencia de ratones con neumosepsis (Horewicz et al., 2015), mientras que, la ausencia del receptor FPR2 ha resultado en procesos inflamatorios severos después de la estimulación con LPS (Giebeler et al., 2014). Por otro lado, en infecciones parasitarias por malaria, la activación de FPR2 reduce la respuesta inflamatoria y, por el contrario, la administración de un antagonista de FPR2 durante la infección por *Plasmodium berghei* puede exacerbar las complicaciones clínicas relacionadas con el paludismo grave (Pádua et al., 2018).

Recientemente, en modelos animales infectados con *T. cruzi* se ha demostrado que, FPR2 es requerido para orquestar la respuesta inmune desde la fase aguda a la crónica, evitando una reacción inflamatoria desequilibrada y el deterioro de la función cardíaca (das Dores et al., 2021). Esto, es consistente con la naturaleza del receptor FPR2, ya que participa tanto en procesos proinflamatorios promoviendo la quimiotaxis de células del sistema inmune, como en procesos proresolutivos (Caso et al., 2021). Este carácter bifásico de FPR2 se evidencia en nuestro modelo experimental, donde la ausencia del receptor conlleva a una respuesta inmunológica de menor magnitud durante la fase aguda que, en el progreso hacia una fase crónica, enlentece el desarrollo de las alteraciones histopatológicas y electrocardiográficas. Sin embargo, esto también nos permite predecir que en una fase crónica avanzada se desarrollaría un estado proinflamatorio prominente que conduciría a la insuficiencia cardíaca, producto de un deficiente proceso resolutivo. Lo cual, ha sido reportado por das Dores y colaboradores, donde ratones FPR2^{-/-} en fase crónica (150 días p.i.) presentan una proporción disminuida de células CD4⁺ y CD8⁺

productoras de IL-10 acompañada por una mayor proporción de linfocitos Th1 y LT CD8⁺ productores de IFN γ , en comparación con ratones WT, lo que da cuenta de un estado proinflamatorio crónico. Además, presentan un aumento del infiltrado inflamatorio en el tejido cardíaco y un deterioro de la despolarización ventricular a los 150 días p.i., sugiriendo que, en ausencia de FPR2, hay un estado proinflamatorio intenso y, por tanto, un peor resultado de la enfermedad (das Dores et al., 2021).

6.2 AT-RvD1 disminuye el proceso inflamatorio en la EC crónica temprana.

Nuestros resultados mostraron que la infección por *T. cruzi* desencadena una fuerte respuesta inflamatoria en la fase aguda, con la producción de citoquinas inflamatorias como IFN γ y TNF α , que activan los macrófagos y participan en el establecimiento de una respuesta inmune adaptativa para eliminar el parásito (Dutra et al., 2014). En el día 60 p.i., los ratones WT mostraron niveles ligeramente aumentados, pero sostenidos, de las citoquinas proinflamatorias TNF α , IFN γ e IL-1 β , lo que refleja un estado inflamatorio en las primeras etapas de la cronicidad. El tratamiento con AT-RvD1 durante la fase crónica temprana redujo significativamente los niveles séricos de IFN γ e IL-1 β , produciendo un efecto inmunorregulador del estado inflamatorio a nivel sistémico. Estos resultados son consistentes con estudios previos, que han demostrado que células mononucleares de sangre periférica (PBMC) obtenidas de pacientes chagásicos en etapa B1 (etapa inicial de CCC) tratados con AT-RvD1 tienen una menor producción de IFN γ después de la reexposición antigénica a *T. cruzi*. Además, la proliferación de las PBMC se reduce, destacando el efecto inmunomodulador de AT-RvD1 (Ogata et al., 2016).

A nivel cardíaco, el escenario contra *T. cruzi* no es muy diferente. Se encontró un desequilibrio con niveles elevados de citoquinas proinflamatorias (TNF α , IFN γ e IL-1 β) y niveles prácticamente inalterados de citoquinas antiinflamatorias (IL-10). Esto es el reflejo de las poblaciones celulares (incluidos macrófagos, linfocitos T citotóxicos y linfocitos T *helper*) que infiltran el tejido cardíaco para coordinar el control de los parásitos y representa una producción exacerbada de citoquinas relacionadas con la destrucción del tejido (Acevedo et al., 2018). Sin embargo, no excluye la participación de otras células cardíacas como fibroblastos, células endoteliales y cardiomiocitos como fuente parcial de estas citoquinas (Machado et al., 2000). Además, el tratamiento con AT-

RvD1 generó un efecto inmunomodulador al reducir drásticamente la producción de TNF α a nivel cardíaco y aumentar la producción de IL-10. Esto sugiere que AT-RvD1 aumenta la proporción de células productoras de IL-10 (posiblemente subpoblaciones de macrófagos, células reguladoras como: Treg y Breg) en el tejido cardíaco para regular el entorno inflamatorio.

Además, la disminución de la producción de TNF α puede ser secundaria al aumento de IL-10, porque esta última es un potente inhibidor de la transcripción de TNF α mediante la activación del factor de transcripción STAT3 en monocitos y macrófagos humanos (Chan et al., 2012). Eso también explicaría por qué, a nivel sistémico, no observamos un efecto reductor del TNF α . Los niveles altos de IL-10 se han asociado con la evasión de la respuesta inmunitaria por diferentes patógenos, incluido *T. cruzi* (Reed et al., 1994), lo que contribuye a un aumento de la mortalidad o la persistencia del daño. Sin embargo, los niveles altos de IL-10 también pueden disminuir la inflamación y la patología; en consecuencia, es necesario un equilibrio pro/antiinflamatorio para la evolución natural de la enfermedad. No obstante, los niveles elevados de IL-10 parecen estar relacionados con el mantenimiento de una función cardíaca adecuada en pacientes asintomáticos con EC crónica (Gomes et al., 2005; Sousa et al., 2014; Vasconcelos et al., 2015). Por lo tanto, el efecto de AT-RvD1 sobre la producción de IL-10 en el corazón parece ser beneficioso para prevenir la progresión de la CCC, ya que los cambios en los niveles de IL-10 se han asociado con la pérdida de la capacidad de controlar la respuesta inmune inflamatoria.

En la CCC el IFN γ se produce en el tejido cardíaco principalmente por los infiltrados de células CD4⁺ y CD8⁺ (Acevedo et al., 2018). A pesar de que AT-RvD1 no produjo una disminución en el RNA mensajero de esta citoquina, se pudo destacar su reducida traducción a proteína. Esto nos permite sugerir la participación de miRNAs como miR146-b regulando la traducción de IFN γ (Rechiuti et al., 2011). Consecuentemente, AT-RvD1 al contrarrestar el ambiente inflamatorio, redujo el infiltrado inflamatorio en el tejido cardíaco y fue más eficiente que benznidazol, mediado por la disminución de moléculas de adhesión celular (VCAM, ICAM) (Bento et al., 2011; Salas-Hernández et al., 2021), junto con la modulación de citoquinas hacia un ambiente antiinflamatorio, como se discutió anteriormente.

Se ha reportado que RvD1 es capaz de modular la respuesta inmune adaptativa, ya que células CD4⁺ y CD8⁺ activadas con PMA/ionomicina al ser incubadas con RvD1 presentan una reducción en la producción de TNF α e IFN γ , sugiriendo que RvD1 regula la respuesta Th1 (Chiurchiú et al., 2016). Es interesante que, en nuestro modelo, AT-RvD1 reduce la presencia de células CD4⁺ productoras de IFN γ en los infiltrados celulares, pero sin reducir la proporción de células CD4⁺. Esto abre la posibilidad de que sean subpoblaciones de linfocitos productores de citoquinas antiinflamatorias, lo que explique en parte las propiedades de AT-RvD1 para incrementar la expresión de IL-10. Las células Treg son una importante subpoblación de linfocitos que están involucrados en la autoregulación de la respuesta inmunológica (Acevedo et al., 2018). Se ha reportado que RvD1 es capaz de favorecer la diferenciación a células Treg incrementando la expresión del factor de transcripción FOXP3, marcadores de supresión como CTL4 y la liberación de citoquinas antiinflamatorias (IL-10), destacando el impacto de RvD1 en la función de las células T al promover la regulación de la inflamación (Chiurchiú et al., 2016).

Estudios anteriores demostraron que las propiedades antiinflamatorias y proresolutivas de AT-RvD1 están mediadas en gran parte por el receptor FPR2 (Bento et al., 2011; Pirault & Bäck 2018). En nuestro modelo, FPR2 participa en la regulación de citoquinas proinflamatorias y antiinflamatorias (IFN γ e IL-1 β), y en la reducción de los infiltrados celulares, ya que su ausencia debilita el efecto producido por AT-RvD1. Es importante mencionar que AT-RvD1 también activa el receptor 32 acoplado a proteína G (GPR32) (Pirault & Bäck 2018). Por lo tanto, la participación del receptor GPR32 podría ser una vía alternativa para la acción de AT-RvD1 y podría explicar la parcialidad de nuestros resultados.

Como se explicó previamente, se ha demostrado que AT-RvD1 ejerce sus efectos antiinflamatorios inhibiendo la vía NF κ B (Lee et al., 2013; Gao et al., 2017). Pudimos observar que los ratones WT y FPR2^{-/-} infectados presentan un cierto grado de actividad de p65, medido a partir de su localización nuclear. Probablemente, esta actividad no es de mayor magnitud debido a la cronicidad de la infección (Wan et al., 2016); pero, aun así, es significativamente mayor a los ratones sanos. Esto sustenta, en conjunto con los resultados anteriores, el establecimiento del estado proinflamatorio leve pero sostenido en la etapa crónica de la infección. El tratamiento con AT-RvD1 redujo el grado de activación

de esta vía inflamatoria, mediado por el receptor FPR2, y esto explicaría en parte el mecanismo por el cual genera los efectos antiinflamatorios y proresolutivos vistos sobre la producción de citoquinas y el infiltrado celular. Por otro lado, el tratamiento con benznidazol también logró reducir de manera significativa la activación de la vía NFκB en los ratones WT. Se ha reportado que, en distintos modelos de infección con *T. cruzi*, el benznidazol podría tener un rol en la modulación de la inflamación (Manarin et al., 2010) a través de la disminución de la actividad de vías de señalización fundamentales en la inflamación, como NFκB y MAPK (Ronco et al., 2011). Esta propiedad del benznidazol ha sido descrita previamente por nuestro grupo de laboratorio, al observar que benznidazol previene la activación endotelial, independientemente de su actividad tripanocida (Campos-Estrada et al., 2015). Estos resultados apoyan la evidencia de que benznidazol es capaz de reducir la actividad de la vía NFκB, sin embargo, el mecanismo se desconoce.

De esta forma, estudios previos han demostrado que benznidazol, además de sus propiedades tripanocidas, reduce los infiltrados de células cardíacas y la producción de mediadores inflamatorios mediante la inhibición de la vía NFκB (Cevey et al., 2015; Rassi et al., 2017), un efecto dependiente de IL-10 aparentemente (Cevey et al., 2015). Sin embargo, en el modelo temprano de EC crónica presentado en este documento, benznidazol no modificó la producción de las citoquinas proinflamatorias (TNFα, IFNγ e IL-1β) y antiinflamatorias (IL-10) estudiadas. Por tanto, sólo hubo una ligera reducción de los infiltrados inflamatorios con el tratamiento con benznidazol. Aunque ambos fármacos actúan inhibiendo la vía NFκB, benznidazol también podría aumentar la producción de especies reactivas de oxígeno a nivel tisular (Ribeiro et al., 2010; Hall & Wilkinson 2012), contribuyendo a la producción y establecimiento de un entorno proinflamatorio. Esto posiblemente explica por qué, aunque benznidazol es eficaz como terapia tripanocida, no reduce los eventos cardiovasculares observados en pacientes con CCC (Morillo et al., 2015).

La lesión más recurrente en la CCC avanzada es la fibrosis y el adelgazamiento de la pared, compatible con una miocardiopatía dilatada. La pérdida de cardiomiocitos, debido a la persistencia del parásito y el consecuente proceso inflamatorio, es característica de la miocarditis, que es mucho menos intensa en pacientes indeterminados. En el presente estudio se observó hipertrofia de cardiomiocitos, evidenciada por un aumento en el área

de sección transversal de las fibras musculares y correlacionada con niveles elevados de péptidos natriuréticos, lo que indica sobrecarga hemodinámica. Junto con la fibrosis intersticial observada, estos hallazgos apuntan a la presencia de una miocarditis característica de la CCC (Bonney et al., 2019).

Hasta el momento, no se había estudiado el efecto de AT-RvD1 sobre la hipertrofia producida por la infección por *T. cruzi*. En este estudio, se demostró que AT-RvD1 reduce tanto el área transversal de los cardiomiocitos como la transcripción de marcadores de hipertrofia como el ANP y el BNP, que se han asociado con diferentes estadios y gravedad de la CCC (Echeverría et al., 2017, Tucci et al., 2020). Además, durante la infección por *T. cruzi*, la participación de endotelina-1, cardiotrofina-1 y citoquinas como TNF α e IL-1 β se han destacado previamente como prohipertroóficas (Corral et al., 2013). Por lo tanto, el efecto de AT-RvD1 sobre la hipertrofia también podría ser una consecuencia de su efecto inmunorregulador (Petersen & Burleigh 2003). Aunque FPR2 media el efecto antihipertrófico de AT-RvD1, no se puede descartar la participación de otros receptores, como GPR32, en este efecto. Este hecho también puede explicar los cambios en la expresión de ANP y BNP observados en los ratones FPR2^{-/-}.

Además, AT-RvD1 redujo la fibrosis cardíaca en nuestro modelo experimental. Este hallazgo es consistente con el de un informe anterior que muestra que la administración de RvD1 a ratones infectados con *T. cruzi* reduce la fibrosis cardíaca y la transcripción del factor de crecimiento transformante- β (TGF- β) en el corazón (Horta et al., 2020). Sin embargo, utilizamos un esquema de tratamiento continuo de 20 días durante la etapa crónica temprana de la infección en lugar de tres administraciones, como en el esquema utilizado por los investigadores citados anteriormente. En modelos experimentales de infarto de miocardio, RvD1 reduce la transcripción de genes profibróticos y disminuye el depósito de colágeno, reduciendo así la fibrosis y mejorando la función ventricular (Kain et al., 2015). Se ha reportado también que LXA₄ disminuye la proliferación de fibroblastos y su migración, limitando la fibrosis (Herrera et al., 2015). Sin embargo, en el presente modelo, AT-RvD1 impidió la diferenciación de fibroblastos a miofibroblastos, consistente con una disminución de la producción de colágeno, y evidenciando la influencia de este lípido proresolutivo sobre los efectos profibróticos de la infección por *T. cruzi*, coincidiendo con los hallazgos de Coelho y cols. (Coelho et al., 2018). Sin embargo, el

efecto de AT-RvD1 sobre la fibrosis no depende exclusivamente de FPR2 ya que el efecto antifibrótico ejercido por AT-RvD1 no se vio afectado en los ratones FPR2^{-/-}. Esto destaca la participación de otros receptores, como GPR32, en la mediación de este efecto, lo que sugiere un nivel de redundancia dentro de la resolución de la cascada de inflamación.

El análisis electrocardiográfico realizado en los animales infectados mostró alteraciones en el intervalo QT en los ratones WT, sugiriendo una ralentización de la repolarización ventricular. Esta alteración aparece precozmente en pacientes con CCC y es un predictor de mortalidad (Salles et al., 2003, Eickhoff et al., 2010). Por lo tanto, la alteración del intervalo QT ayudó a confirmar la naturaleza crónica del modelo, siendo además importante considerar que, tanto el tratamiento como las observaciones realizadas fueron en una fase crónica temprana. Puede ser necesario un período de observación más prolongado para hallar cambios significativos en la función eléctrica cardíaca a consecuencia de AT-RvD1. Además, la evaluación de las alteraciones cardíacas, especialmente los cambios electrocardiográficos, al inicio de la fase crónica puede no producir cambios significativos, como probablemente sea el caso en el presente estudio, constituyendo una debilidad de los resultados proporcionados. Nuestros resultados sugieren que el tratamiento con AT-RvD1 reduce las leves alteraciones electrocardiográficas del modelo murino utilizado, pero no con mayor eficiencia que el benznidazol.

Sin embargo, el efecto de AT-RvD1 sobre los eventos fisiopatológicos que ocurren en esta etapa de la enfermedad, como se observa en los cambios en la hipertrofia y fibrosis, así como en los marcadores bioquímicos de la función cardíaca, sugiere la potencial utilidad de las modificaciones del factor huésped en la terapéutica de la enfermedad de Chagas, especialmente para prevenir el deterioro crónico debido a efectos inflamatorios.

6.3 AT-RvD1 reduce la carga parasitaria cardíaca en ratones infectados por *T. cruzi*.

Es importante destacar que AT-RvD1 no tiene actividad tripanocida. Sin embargo, observamos que AT-RvD1 redujo la carga de parásitos cardíacos en ratones infectados. Estudios en modelos experimentales de CCC han indicado que la administración de otros SPMs, como 15-epi-LXA₄, reduce de manera similar la carga de parásitos del tejido cardíaco en ratones infectados (González-Herrera et al., 2017). Además, en nuestros

resultados se observó que, en ausencia de FPR2, la eliminación del parásito del tejido cardíaco no es tan eficiente, lo que sugiere que la cascada de proresolución es esencial para promover la eliminación del parásito.

Probablemente, el efecto antiinflamatorio de AT-RvD1 reduce el efecto deletéreo del entorno inflamatorio que favorece la persistencia del parásito. Los procesos proresolutivos iniciados por AT-RvD1 permiten que el sistema inmunológico elimine los parásitos, probablemente porque la inflamación crónica es un mecanismo evasivo utilizado por los parásitos (Nardy et al., 2015).

En conjunto con lo anterior, el aclaramiento del parásito probablemente es producto de la eferocitosis inducida por AT-RvD1 (Karaji & Sattentau 2017). Mediadores proresolutivos (SPMs) potencian la fagocitosis y eferocitosis de *debris* celulares, microorganismos y células apoptóticas, como parte importante del proceso resolutivo de la inflamación (Decker et al., 2021). La eferocitosis es un proceso conservado evolutivamente, que ocurre gracias al reconocimiento de señales fagocíticas “*eat me*” por receptores presentes en los macrófagos (Mehrotra et al., 2022; Kojima et al., 2017). Consecuentemente, AT-RvD1 ha demostrado incrementar la eferocitosis de macrófagos y acelerar la eliminación de neutrófilos en modelos experimentales de infecciones bacterianas como neumonía por *P. aeruginosa*, donde estos efectos fueron favorables y sumativos a la terapia con antibióticos (Abdulnour et al., 2016; Codagnone et al., 2018). Adicionalmente, RvD1 mediante el receptor FPR2 ha demostrado potenciar, en macrófagos humanos, la exposición en superficie de receptores como MerTK, CD163 y CD206 que reconocen señales “*eat me*” (Rymut et al., 2020). Se ha reportado que, RvD1 estimula el reconocimiento y engullimiento de células necroptóticas enteras por parte de macrófagos, mediante la inhibición de RhoA y la activación de CDC42 (Gerlach et al., 2019). Sin embargo, la eferocitosis implica que las células infectadas estén próximas a la muerte o presenten señales fagocíticas que puedan ser identificadas por los macrófagos; por lo tanto, el mecanismo involucrado en tal proceso podría no estar claro y es de interés para futuras investigaciones.

7. CONCLUSION

A partir de los resultados y antecedentes discutidos podemos concluir que, AT-RvD1 es eficaz promoviendo la resolución de la inflamación, atenuando las respuestas inflamatorias patológicas y restaurando la homeostasis tisular. El tratamiento con AT-RvD1 en la fase crónica de la infección con *T. cruzi*, contrarresta el ambiente inflamatorio adverso a nivel cardiaco, reduciendo la actividad de la vía NFκB, la expresión de citoquinas proinflamatorias (TNFα, IFNγ, IL-1β) y aumentando la expresión de citoquinas antiinflamatorias (IL-10), mediante el receptor FPR2, al menos parcialmente, ya que queda en evidencia la participación de vías alternativas, como el receptor GPR32, con el cual comparte funciones resolutivas (Figura 18).

Consecuentemente, AT-RvD1 reduce las alteraciones histopatológicas características de la CCC, donde el receptor FPR2 cumple un rol mediador en la reducción del infiltrado inflamatorio y la hipertrofia cardiaca, no así sobre la fibrosis, donde vías complementarias estarían mediando dicho efecto. Además, AT-RvD1 permite una eliminación de parásitos de manera más eficiente, por promover la eferocitosis de los macrófagos.

En conclusión, la resolución de la inflamación puede ser ventajosa como estrategia terapéutica potencial para la CCC, ayudando a mejorar los regímenes de tratamiento existentes con los fármacos antichagásicos de uso actual.

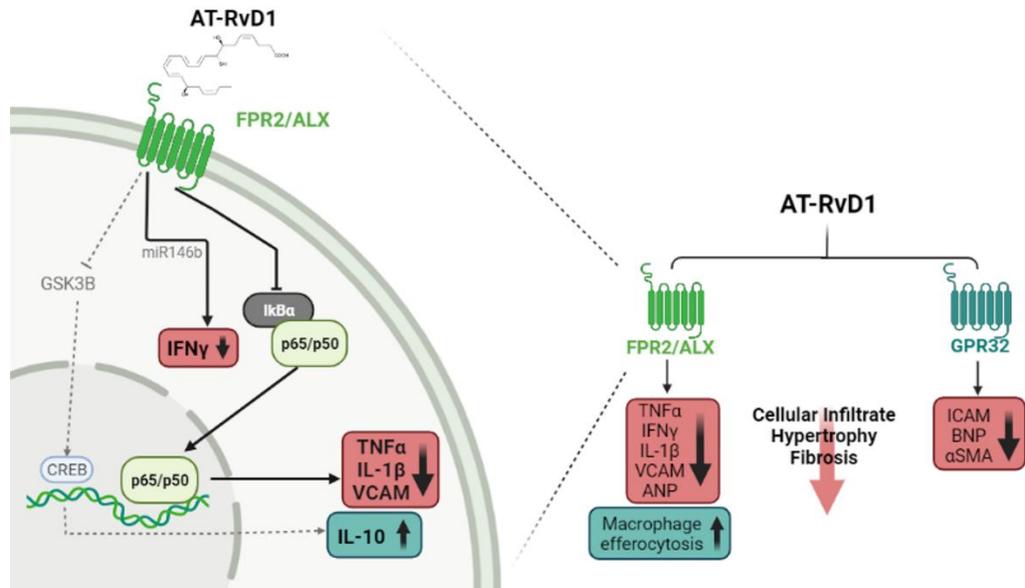


Figura 18. Esquema resumen de los efectos y posibles mecanismos de acción de AT-RvD1. Se aprecia que, AT-RvD1 mediante el receptor FPR2 inhibe la vía NFκB y con ello, reduce la expresión de TNFα, IL-1β, VCAM. Adicionalmente, AT-RvD1 podría estar regulando la traducción de IFNγ mediante micro RNAs como miR146b. Por otro lado, el incremento de la expresión de IL-10 puede deberse a la inhibición de GSK3B y consecuente activación de CREB. A la derecha, se destaca el rol del receptor FPR2 en la disminución de las alteraciones histopatológicas y marcadores moleculares evaluados, como también la participación de vías alternativas, sugiriendo al receptor GPR32 como mediador de dichos efectos.

8. REFERENCIAS

- Abdulnour, R. E., Sham, H. P., Douada, D. N., Colas, R. A., Dalli, J., Bai, Y., Ai, X., Serhan, C. N., & Levy, B. D. (2016). Aspirin-triggered resolvin D1 is produced during self-resolving gram-negative bacterial pneumonia and regulates host immune responses for the resolution of lung inflammation. *Mucosal immunology*, 9(5), 1278–1287. <https://doi.org/10.1038/mi.2015.129>
- Abel, L. C., Rizzo, L. V., Ianni, B., Albuquerque, F., Bacal, F., Carrara, D., Bocchi, E. A., Teixeira, H. C., Mady, C., Kalil, J., & Cunha-Neto, E. (2001). Chronic Chagas' disease cardiomyopathy patients display an increased IFN-gamma response to *Trypanosoma cruzi* infection. *Journal of autoimmunity*, 17(1), 99–107. <https://doi.org/10.1006/jaut.2001.0523>
- Acevedo, G. R., Girard, M. C., & Gómez, K. A. (2018). The Unsolved Jigsaw Puzzle of the Immune Response in Chagas Disease. *Frontiers in immunology*, 9, 1929. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2018.01929>
- Angheben, A., Boix, L., Buonfrate, D., Gobbi, F., Bisoffi, Z., Pupella, S., Gandini, G., & Aprili, G. (2015). Chagas disease and transfusion medicine: a perspective from non-endemic countries. *Blood transfusion = Trasfusione del sangue*, 13(4), 540–550. <https://doi.org/10.2450/2015.0040-15>
- Alsford, S., Eckert, S., Baker, N., Glover, L., Sanchez-Flores, A., Leung, K. F., Turner, D. J., Field, M. C., Berriman, M., & Horn, D. (2012). High-throughput decoding of antitrypanosomal drug efficacy and resistance. *Nature*, 482(7384), 232–236. <https://doi.org/10.1038/nature10771>
- Apt W. (2010). Current and developing therapeutic agents in the treatment of Chagas disease. *Drug design, development and therapy*, Drug Des Devel Ther. 4, 243–253. <https://doi.org/10.2147/dddt.s8338>
- Barnig, C., Cernadas, M., Dutile, S., Liu, X., Perrella, M. A., Kazani, S., Wechsler, M. E., Israel, E., & Levy, B. D. (2013). Lipoxin A4 regulates natural killer cell and type 2 innate lymphoid cell activation in asthma. *Science translational medicine*, 5(174), 174ra26. <https://doi.org/10.1126/scitranslmed.3004812>

- Basil, M. C., & Levy, B. D. (2016). Specialized pro-resolving mediators: endogenous regulators of infection and inflammation. *Nature reviews. Immunology*, *16*(1), 51–67. <https://doi.org/10.1038/nri.2015.4>
- Bento, A. F., Claudino, R. F., Dutra, R. C., Marcon, R., & Calixto, J. B. (2011). Omega-3 fatty acid-derived mediators 17(R)-hydroxy docosahexaenoic acid, aspirin-triggered resolvin D1 and resolvin D2 prevent experimental colitis in mice. *Journal of immunology (Baltimore, Md.: 1950)*, *187*(4), 1957–1969. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.1101305>
- Beurel, E., Michalek, S. M., & Jope, R. S. (2010). Innate and adaptive immune responses regulated by glycogen synthase kinase-3 (GSK3). *Trends in immunology*, *31*(1), 24–31. <https://doi.org/10.1016/j.it.2009.09.007>
- Bonney, K. M., Luthringer, D. J., Kim, S. A., Garg, N. J., & Engman, D. M. (2019). Pathology and Pathogenesis of Chagas Heart Disease. *Annual review of pathology*, *14*, 421–447. <https://doi.org/10.1146/annurev-pathol-020117-043711>
- Campos, M. C., Leon, L. L., Taylor, M. C., & Kelly, J. M. (2014). Benznidazole-resistance in *Trypanosoma cruzi*: evidence that distinct mechanisms can act in concert. *Molecular and biochemical parasitology*, *193*(1), 17–19. <https://doi.org/10.1016/j.molbiopara.2014.01.002>
- Campos-Estrada, C., Liempi, A., González-Herrera, F., Lapier, M., Kemmerling, U., Pesce, B., Ferreira, J., López-Muñoz, R., & Maya, J. D. (2015). Simvastatin and Benznidazole-Mediated Prevention of *Trypanosoma cruzi*-Induced Endothelial Activation: Role of 15-epi-lipoxin A4 in the Action of Simvastatin. *PLoS neglected tropical diseases*, *9*(5), e0003770. <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0003770>
- Canavaci, A. M., Sorgi, C. A., Martins, V. P., Morais, F. R., de Sousa, É. V., Trindade, B. C., Cunha, F. Q., Rossi, M. A., Aronoff, D. M., Faccioli, L. H., & Nomizo, A. (2014). The acute phase of *Trypanosoma cruzi* infection is attenuated in 5-lipoxygenase-deficient mice. *Mediators of inflammation*, *2014*, 893634. <https://doi.org/10.1155/2014/893634>
- Cardillo, F., de Pinho, R. T., Antas, P. R., & Mengel, J. (2015). Immunity and immune modulation in *Trypanosoma cruzi* infection. *Pathogens and disease*, *73*(9), ftv082. <https://doi.org/10.1093/femspd/ftv082>

- Caso, V. M., Manzo, V., Pecchillo Cimmino, T., Conti, V., Caso, P., Esposito, G., Russo, V., Filippelli, A., Ammendola, R., & Cattaneo, F. (2021). Regulation of Inflammation and Oxidative Stress by Formyl Peptide Receptors in Cardiovascular Disease Progression. *Life (Basel, Switzerland)*, 11(3), 243. <https://doi.org/10.3390/life11030243>
- Cattaneo, F., Parisi, M., & Ammendola, R. (2013). Distinct signaling cascades elicited by different formyl peptide receptor 2 (FPR2) agonists. *International journal of molecular sciences*, 14(4), 7193–7230. <https://doi.org/10.3390/ijms14047193>
- Cattaneo, F., Russo, R., Castaldo, M., Chambery, A., Zollo, C., Esposito, G., Pedone, P. V., & Ammendola, R. (2019). Phosphoproteomic analysis sheds light on intracellular signaling cascades triggered by Formyl-Peptide Receptor 2. *Scientific reports*, 9(1), 17894. <https://doi.org/10.1038/s41598-019-54502-6>
- Cevey, Á. C., Mirkin, G. A., Penas, F. N., & Goren, N. B. (2015). Low-dose benzimidazole treatment results in parasite clearance and attenuates heart inflammatory reaction in an experimental model of infection with a highly virulent *Trypanosoma cruzi* strain. *International journal for parasitology. Drugs and drug resistance*, 6(1), 12–22. <https://doi.org/10.1016/j.ijpddr.2015.12.001>
- Chan, C. S., Ming-Lum, A., Golds, G. B., Lee, S. J., Anderson, R. J., & Mui, A. L. (2012). Interleukin-10 inhibits lipopolysaccharide-induced tumor necrosis factor- α translation through a SHIP1-dependent pathway. *The Journal of biological chemistry*, 287(45), 38020–38027. <https://doi.org/10.1074/jbc.M112.348599>
- Chiang, N., & Serhan, C. N. (2020). Specialized pro-resolving mediator network: an update on production and actions. *Essays in biochemistry*, 64(3), 443–462. <https://doi.org/10.1042/EBC20200018>
- Chiurchiù, V., Leuti, A., Dalli, J., Jacobsson, A., Battistini, L., Maccarrone, M., & Serhan, C. N. (2016). Proresolving lipid mediators resolvin D1, resolvin D2, and maresin 1 are critical in modulating T cell responses. *Science translational medicine*, 8(353), 353ra111. <https://doi.org/10.1126/scitranslmed.aaf7483>
- Coelho, L. L., Pereira, I. R., Pereira, M., Mesquita, L., Lannes-Vieira, J., Adesse, D., & Garzoni, L. R. (2018). *Trypanosoma cruzi* activates mouse cardiac fibroblasts in vitro

leading to fibroblast-myofibroblast transition and increase in expression of extracellular matrix proteins. *Parasites & vectors*, 11(1), 72. <https://doi.org/10.1186/s13071-018-2614-1>

Codagnone M, Cianci E, Lamolinara A, Mari VC, Nespoli A, Isopi E, Mattoscio D, Arita M, Bragonzi A, Iezzi M, Romano M, Recchiuti A. Resolvin D1 enhances the resolution of lung inflammation caused by long-term *Pseudomonas aeruginosa* infection. *Mucosal Immunol*. 2018 Jan;11(1):35-49. doi: 10.1038/mi.2017.36. Epub 2017 Apr 19. PMID: 28422188.

Corral, R. S., Guerrero, N. A., Cuervo, H., Gironès, N., & Fresno, M. (2013). Trypanosoma cruzi infection and endothelin-1 cooperatively activate pathogenic inflammatory pathways in cardiomyocytes. *PLoS neglected tropical diseases*, 7(2), e2034. <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0002034>

Coura J. R. (2007). Chagas disease: what is known and what is needed--a background article. *Memorias do Instituto Oswaldo Cruz*, 102 Suppl 1, 113–122. <https://doi.org/10.1590/s0074-02762007000900018>

Coura, J. R., & Dias, J. C. (2009). Epidemiology, control and surveillance of Chagas disease: 100 years after its discovery. *Memorias do Instituto Oswaldo Cruz*, 104 Suppl 1, 31–40. <https://doi.org/10.1590/s0074-02762009000900006>

Cruz, J. S., Machado, F. S., Ropert, C., & Roman-Campos, D. (2017). Molecular mechanisms of cardiac electromechanical remodeling during Chagas disease: Role of TNF and TGF- β . *Trends in cardiovascular medicine*, 27(2), 81–91. <https://doi.org/10.1016/j.tcm.2016.08.003>

das Dores Pereira, R., Rabelo, R., Leite, P. G., Cramer, A., Botelho, A., Cruz, J. S., Régis, W., Perretti, M., Teixeira, M. M., & Machado, F. S. (2021). Role of formyl peptide receptor 2 (FPR2) in modulating immune response and heart inflammation in an experimental model of acute and chronic Chagas disease. *Cellular immunology*, 369, 104427. <https://doi.org/10.1016/j.cellimm.2021.104427>

Dattani, A., Drammeh, I., Mahmood, A., Rahman, M., Szular, J., & Wilkinson, S. R. (2021). Unraveling the antitrypanosomal mechanism of benznidazole and related 2-

- nitroimidazoles: From prodrug activation to DNA damage. *Molecular microbiology*, 116(2), 674–689. <https://doi.org/10.1111/mmi.14763>
- de Araújo, F. F., Corrêa-Oliveira, R., Rocha, M. O., Chaves, A. T., Fiuza, J. A., Fares, R. C., Ferreira, K. S., Nunes, M. C., Keesen, T. S., Damasio, M. P., Teixeira-Carvalho, A., & Gomes, J. A. (2012). Foxp3+CD25(high) CD4+ regulatory T cells from indeterminate patients with Chagas disease can suppress the effector cells and cytokines and reveal altered correlations with disease severity. *Immunobiology*, 217(8), 768–777. <https://doi.org/10.1016/j.imbio.2012.04.008>
- Decker C, Sadhu S, Fredman G. Pro-Resolving Ligands Orchestrate Phagocytosis. *Front Immunol*. 2021 Jun 10;12:660865. doi: 10.3389/fimmu.2021.660865. PMID: 34177900; PMCID: PMC8222715.
- Díaz-Viraqué, F., Chiribao, M. L., Trochine, A., González-Herrera, F., Castillo, C., Liempi, A., Kemmerling, U., Maya, J. D., & Robello, C. (2018). Old Yellow Enzyme from *Trypanosoma cruzi* Exhibits In Vivo Prostaglandin F2 α Synthase Activity and Has a Key Role in Parasite Infection and Drug Susceptibility. *Frontiers in immunology*, 9, 456. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2018.00456>
- Dufton, N., Hannon, R., Brancaleone, V., Dalli, J., Patel, H. B., Gray, M., D'Acquisto, F., Buckingham, J. C., Perretti, M., & Flower, R. J. (2010). Anti-inflammatory role of the murine formyl-peptide receptor 2: ligand-specific effects on leukocyte responses and experimental inflammation. *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)*, 184(5), 2611–2619. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.0903526>
- Dutra, W. O., Menezes, C. A., Magalhães, L. M., & Gollob, K. J. (2014). Immunoregulatory networks in human Chagas disease. *Parasite immunology*, 36(8), 377–387. <https://doi.org/10.1111/pim.12107>
- Echavarría, N. G., Echeverría, L. E., Stewart, M., Gallego, C., & Saldarriaga, C. (2021). Chagas Disease: Chronic Chagas Cardiomyopathy. *Current problems in cardiology*, 46(3), 100507. <https://doi.org/10.1016/j.cpcardiol.2019.100507>
- Echeverría, L. E., Rojas, L. Z., Calvo, L. S., Roa, Z. M., Rueda-Ochoa, O. L., Morillo, C. A., Muka, T., & Franco, O. H. (2017). Profiles of cardiovascular biomarkers according to

- severity stages of Chagas cardiomyopathy. *International journal of cardiology*, 227, 577–582. <https://doi.org/10.1016/j.ijcard.2016.10.098>
- Echeverria, L. E., & Morillo, C. A. (2019). American Trypanosomiasis (Chagas Disease). *Infectious disease clinics of North America*, 33(1), 119–134. <https://doi.org/10.1016/j.idc.2018.10.015>
- Eickhoff, C. S., Lawrence, C. T., Sagartz, J. E., Bryant, L. A., Labovitz, A. J., Gala, S. S., & Hoft, D. F. (2010). ECG detection of murine chagasic cardiomyopathy. *The Journal of parasitology*, 96(4), 758–764. <https://doi.org/10.1645/GE-2396.1>
- Esper, L., Talvani, A., Pimentel, P., Teixeira, M. M., & Machado, F. S. (2015). Molecular mechanisms of myocarditis caused by *Trypanosoma cruzi*. *Current opinion in infectious diseases*, 28(3), 246–252. <https://doi.org/10.1097/QCO.0000000000000157>
- Esper, L., Roman-Campos, D., Lara, A., Brant, F., Castro, L. L., Barroso, A., Araujo, R. R., Vieira, L. Q., Mukherjee, S., Gomes, E. R., Rocha, N. N., Ramos, I. P., Lisanti, M. P., Campos, C. F., Arantes, R. M., Guatimosim, S., Weiss, L. M., Cruz, J. S., Tanowitz, H. B., Teixeira, M. M., Machado, F. S. (2012). Role of SOCS2 in modulating heart damage and function in a murine model of acute Chagas disease. *The American journal of pathology*, 181(1), 130–140. <https://doi.org/10.1016/j.ajpath.2012.03.042>
- Ferreira, R. C., Ianni, B. M., Abel, L. C., Buck, P., Mady, C., Kalil, J., & Cunha-Neto, E. (2003). Increased plasma levels of tumor necrosis factor- α in asymptomatic/"indeterminate" and Chagas disease cardiomyopathy patients. *Memorias do Instituto Oswaldo Cruz*, 98(3), 407–411. <https://doi.org/10.1590/s0074-02762003000300021>
- Ferreira, B. L., Ferreira, É. R., de Brito, M. V., Salu, B. R., Oliva, M., Mortara, R. A., & Orikaza, C. M. (2018). BALB/c and C57BL/6 Mice Cytokine Responses to *Trypanosoma cruzi* Infection Are Independent of Parasite Strain Infectivity. *Frontiers in microbiology*, 9, 553. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2018.00553>
- Flávia Nardy, A., Freire-de-Lima, C. G., & Morrot, A. (2015). Immune Evasion Strategies of *Trypanosoma cruzi*. *Journal of immunology research*, 2015, 178947. <https://doi.org/10.1155/2015/178947>

- Fullerton, J. N., & Gilroy, D. W. (2016). Resolution of inflammation: a new therapeutic frontier. *Nature reviews. Drug discovery*, 15(8), 551–567. <https://doi.org/10.1038/nrd.2016.39>
- Gabl, M., Winther, M., Skovbakke, S. L., Bylund, J., Dahlgren, C., & Forsman, H. (2014). A pepducin derived from the third intracellular loop of FPR2 is a partial agonist for direct activation of this receptor in neutrophils but a full agonist for cross-talk triggered reactivation of FPR2. *PloS one*, 9(10), e109516. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0109516>
- Gao, Y., Zhang, H., Luo, L., Lin, J., Li, D., Zheng, S., Huang, H., Yan, S., Yang, J., Hao, Y., Li, H., Gao Smith, F., & Jin, S. (2017). Resolvin D1 Improves the Resolution of Inflammation via Activating NFκB p50/p50-Mediated Cyclooxygenase-2 Expression in Acute Respiratory Distress Syndrome. *Journal of immunology (Baltimore, Md.: 1950)*, 199(6), 2043–2054. Advance online publication. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.1700315>
- Ge, Y., Zhang, S., Wang, J., Xia, F., Wan, J. B., Lu, J., & Ye, R. D. (2020). Dual modulation of formyl peptide receptor 2 by aspirin-triggered lipoxin contributes to its anti-inflammatory activity. *FASEB journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology*, 34(5), 6920–6933. <https://doi.org/10.1096/fj.201903206R>
- Gerlach BD, Marinello M, Heinz J, Rymut N, Sansbury BE, Riley CO, Sadhu S, Hosseini Z, Kojima Y, Tang DD, Leeper NJ, Spite M, Barroso M, Rayner KJ, Fredman G. Resolvin D1 promotes the targeting and clearance of necroptotic cells. *Cell Death Differ*. 2020 Feb;27(2):525-539. doi: 10.1038/s41418-019-0370-1. Epub 2019 Jun 20. PMID: 31222041; PMCID: PMC7206090.
- Giebeler, A., Streetz, K. L., Soehnlein, O., Neumann, U., Wang, J. M., & Brandenburg, L. O. (2014). Deficiency of formyl peptide receptor 1 and 2 is associated with increased inflammation and enhanced liver injury after LPS-stimulation. *PloS one*, 9(6), e100522. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0100522>

- Gomes, J. A., Bahia-Oliveira, L. M., Rocha, M. O., Busek, S. C., Teixeira, M. M., Silva, J. S., & Correa-Oliveira, R. (2005). Type 1 chemokine receptor expression in Chagas' disease correlates with morbidity in cardiac patients. *Infection and immunity*, 73(12), 7960–7966. <https://doi.org/10.1128/IAI.73.12.7960-7966.2005>
- González-Herrera, F., Cramer, A., Pimentel, P., Castillo, C., Liempi, A., Kemmerling, U., Machado, F. S., & Maya, J. D. (2017). Simvastatin Attenuates Endothelial Activation through 15-Epi-Lipoxin A4 Production in Murine Chronic Chagas Cardiomyopathy. *Antimicrobial agents and chemotherapy*, 61(3), e02137-16. <https://doi.org/10.1128/AAC.02137-16>
- Gu, Z., Lamont, G. J., Lamont, R. J., Uriarte, S. M., Wang, H., & Scott, D. A. (2016). Resolvin D1, resolvin D2 and maresin 1 activate the GSK3 β anti-inflammatory axis in TLR4-engaged human monocytes. *Innate immunity*, 22(3), 186–195. <https://doi.org/10.1177/1753425916628618>
- Hall, B. S., Bot, C., & Wilkinson, S. R. (2011). Nifurtimox activation by trypanosomal type I nitroreductases generates cytotoxic nitrile metabolites. *The Journal of biological chemistry*, 286(15), 13088–13095. <https://doi.org/10.1074/jbc.M111.230847>
- Hall, B. S., & Wilkinson, S. R. (2012). Activation of benznidazole by trypanosomal type I nitroreductases results in glyoxal formation. *Antimicrobial agents and chemotherapy*, 56(1), 115–123. <https://doi.org/10.1128/AAC.05135-11>
- He, H. Q., Liao, D., Wang, Z. G., Wang, Z. L., Zhou, H. C., Wang, M. W., & Ye, R. D. (2013). Functional characterization of three mouse formyl peptide receptors. *Molecular pharmacology*, 83(2), 389–398. <https://doi.org/10.1124/mol.112.081315>
- Herrera, B. S., Kantarci, A., Zarroug, A., Hasturk, H., Leung, K. P., & Van Dyke, T. E. (2015). LXA4 actions direct fibroblast function and wound closure. *Biochemical and biophysical research communications*, 464(4), 1072–1077. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2015.07.076>
- Hiram R. (2022). Resolution-promoting autacoids demonstrate promising cardioprotective effects against heart diseases. *Molecular biology reports*, 10.1007/s11033-022-07230-6. Advance online publication. <https://doi.org/10.1007/s11033-022-07230-6>

- Horewicz, V. V., Crestani, S., de Sordi, R., Rezende, E., & Assreuy, J. (2015). FPR2/ALX activation reverses LPS-induced vascular hyporeactivity in aorta and increases survival in a pneumosepsis model. *European journal of pharmacology*, 746, 267–273. <https://doi.org/10.1016/j.ejphar.2014.11.026>
- Horta, A. L., Williams, T., Han, B., Ma, Y., Menezes, A., Tu, V., Talvani, A., Weiss, L. M., & Huang, H. (2020). Resolvin D1 Administration Is Beneficial in *Trypanosoma cruzi* Infection. *Infection and immunity*, 88(6), e00052-20. <https://doi.org/10.1128/IAI.00052-20>
- Kain, V., Ingle, K. A., Colas, R. A., Dalli, J., Prabhu, S. D., Serhan, C. N., Joshi, M., & Halade, G. V. (2015). Resolvin D1 activates the inflammation resolving response at splenic and ventricular site following myocardial infarction leading to improved ventricular function. *Journal of molecular and cellular cardiology*, 84, 24–35. <https://doi.org/10.1016/j.yjmcc.2015.04.003>
- Karaji, N., & Sattentau, Q. J. (2017). Efferocytosis of Pathogen-Infected Cells. *Frontiers in immunology*, 8, 1863. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2017.01863>
- Kaplan, S., Kursat, A., Sora, E., Ergin, S., Gunal, S., Bilginer G. (2018). A survey on ECG analysis. *Biomedical Signal Processing and Control*. 43:216-235. <https://doi.org/10.1016/j.bspc.2018.03.003>
- Kojima, Y., Weissman, I. L., & Leeper, N. J. (2017). The Role of Efferocytosis in Atherosclerosis. *Circulation*, 135(5), 476–489. <https://doi.org/10.1161/CIRCULATIONAHA.116.025684>
- Krishnamoorthy, S., Recchiuti, A., Chiang, N., Fredman, G., & Serhan, C. N. (2012). Resolvin D1 receptor stereoselectivity and regulation of inflammation and proresolving microRNAs. *The American journal of pathology*, 180(5), 2018–2027. <https://doi.org/10.1016/j.ajpath.2012.01.028>
- Kubota, T., McTiernan, C. F., Frye, C. S., Slawson, S. E., Lemster, B. H., Koretsky, A. P., Demetris, A. J., & Feldman, A. M. (1997). Dilated cardiomyopathy in transgenic mice with cardiac-specific overexpression of tumor necrosis factor-alpha. *Circulation research*, 81(4), 627–635. <https://doi.org/10.1161/01.res.81.4.627>

- Lee, H. N., Kundu, J. K., Cha, Y. N., & Surh, Y. J. (2013). Resolvin D1 stimulates efferocytosis through p50/p50-mediated suppression of tumor necrosis factor- α expression. *Journal of cell science*, 126(Pt 17), 4037–4047. <https://doi.org/10.1242/jcs.131003>
- Lescure, F. X., Le Loup, G., Freilij, H., Develoux, M., Paris, L., Brutus, L., & Pialoux, G. (2010). Chagas disease: changes in knowledge and management. *The Lancet. Infectious diseases*, 10(8), 556–570. [https://doi.org/10.1016/S1473-3099\(10\)70098-0](https://doi.org/10.1016/S1473-3099(10)70098-0)
- Lidani, K., Andrade, F. A., Bavia, L., Damasceno, F. S., Beltrame, M. H., Messias-Reason, I. J., & Sandri, T. L. (2019). Chagas Disease: From Discovery to a Worldwide Health Problem. *Frontiers in public health*, 7, 166. <https://doi.org/10.3389/fpubh.2019.00166>
- López-Muñoz, R. A., Molina-Berrios, A., Campos-Estrada, C., Abarca-Sanhueza, P., Urrutia-Llancaqueo, L., Peña-Espinoza, M., & Maya, J. D. (2018). Inflammatory and Pro-resolving Lipids in Trypanosomatid Infections: A Key to Understanding Parasite Control. *Frontiers in microbiology*, 9, 1961. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2018.01961>
- Machado, F. S., Martins, G. A., Aliberti, J. C., Mestriner, F. L., Cunha, F. Q., & Silva, J. S. (2000). Trypanosoma cruzi-infected cardiomyocytes produce chemokines and cytokines that trigger potent nitric oxide-dependent trypanocidal activity. *Circulation*, 102(24), 3003–3008. <https://doi.org/10.1161/01.cir.102.24.3003>
- Machado, F. S., Dutra, W. O., Esper, L., Gollob, K. J., Teixeira, M. M., Factor, S. M., Weiss, L. M., Nagajyothi, F., Tanowitz, H. B., & Garg, N. J. (2012). Current understanding of immunity to Trypanosoma cruzi infection and pathogenesis of Chagas disease. *Seminars in immunopathology*, 34(6), 753–770. <https://doi.org/10.1007/s00281-012-0351-7>
- Maderna, P., Cottell, D. C., Toivonen, T., Dufton, N., Dalli, J., Perretti, M., & Godson, C. (2010). FPR2/ALX receptor expression and internalization are critical for lipoxin A4 and annexin-derived peptide-stimulated phagocytosis. *FASEB journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology*, 24(11), 4240–4249. <https://doi.org/10.1096/fj.10-159913>
- Malik, L. H., Singh, G. D., & Amsterdam, E. A. (2015). The Epidemiology, Clinical Manifestations, and Management of Chagas Heart Disease. *Clinical cardiology*, 38(9), 565–569. <https://doi.org/10.1002/clc.22421>

- Manarin, R., Pascutti, M. F., Ruffino, J. P., De Las Heras, B., Boscá, L., Bottasso, O., Revelli, S., & Serra, E. (2010). Benznidazole blocks NF-kappaB activation but not AP-1 through inhibition of IKK. *Molecular immunology*, 47(15), 2485–2491. <https://doi.org/10.1016/j.molimm.2010.06.002>
- Marin-Neto, J. A., Cunha-Neto, E., Maciel, B. C., & Simões, M. V. (2007). Pathogenesis of chronic Chagas heart disease. *Circulation*, 115(9), 1109–1123. <https://doi.org/10.1161/CIRCULATIONAHA.106.624296>
- Martí-Carvajal, A. J., & Kwong, J. S. (2016). Pharmacological interventions for treating heart failure in patients with Chagas cardiomyopathy. *The Cochrane database of systematic reviews*, 7(7), CD009077. <https://doi.org/10.1002/14651858.CD009077.pub3>
- Mehrotra P, Ravichandran KS. Drugging the efferocytosis process: concepts and opportunities. *Nat Rev Drug Discov*. 2022 Jun 1:1–20. doi: 10.1038/s41573-022-00470-y. Epub ahead of print. PMID: 35650427; PMCID: PMC9157040.
- Mills R. M. (2020). Chagas Disease: Epidemiology and Barriers to Treatment. *The American journal of medicine*, 133(11), 1262–1265. <https://doi.org/10.1016/j.amjmed.2020.05.022>
- Ministerio de Salud, Gobierno de Chile (MINSAL) (2018) Situación epidemiológica de la enfermedad de la Enfermedad de Chagas [documento pdf]. Recuperado de: <https://diprece.minsal.cl/wp-content/uploads/2018/11/Situaci%C3%B3n-Epidemiologica-Nacional.-Dr.-Adolfo-Cesped..pdf>
- Miyahara, T., Runge, S., Chatterjee, A., Chen, M., Mottola, G., Fitzgerald, J. M., Serhan, C. N., & Conte, M. S. (2013). D-series resolvins attenuates vascular smooth muscle cell activation and neointimal hyperplasia following vascular injury. *FASEB journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology*, 27(6), 2220–2232. <https://doi.org/10.1096/fj.12-225615>
- Molina-Berríos, A., Campos-Estrada, C., Henriquez, N., Faúndez, M., Torres, G., Castillo, C., Escanilla, S., Kemmerling, U., Morello, A., López-Muñoz, R. A., & Maya, J. D. (2013a). Protective role of acetylsalicylic acid in experimental *Trypanosoma cruzi* infection: evidence of a 15-epi-lipoxin A₄-mediated effect. *PLoS neglected tropical diseases*, 7(4), e2173. <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0002173>

- Molina-Berríos, A., Campos-Estrada, C., Lapier, M., Duaso, J., Kemmerling, U., Galanti, N., Ferreira, J., Morello, A., López-Muñoz, R., & Maya, J. D. (2013b). Protection of vascular endothelium by aspirin in a murine model of chronic Chagas' disease. *Parasitology research*, 112(7), 2731–2739. <https://doi.org/10.1007/s00436-013-3444-x>
- Moreira, M., & Renan Cunha-Melo, J. (2020). Chagas Disease Infection Reactivation after Heart Transplant. *Tropical medicine and infectious disease*, 5(3), 106. <https://doi.org/10.3390/tropicalmed5030106>
- Morillo, C. A., Marin-Neto, J. A., Avezum, A., Sosa-Estani, S., Rassi, A., Jr, Rosas, F., Villena, E., Quiroz, R., Bonilla, R., Britto, C., Guhl, F., Velazquez, E., Bonilla, L., Meeks, B., Rao-Melacini, P., Pogue, J., Mattos, A., Lazdins, J., Rassi, A., Connolly, S. J., & BENEFIT Investigators (2015). Randomized Trial of Benznidazole for Chronic Chagas' Cardiomyopathy. *The New England journal of medicine*, 373(14), 1295–1306. <https://doi.org/10.1056/NEJMoa1507574>
- Mottola, G., Chatterjee, A., Wu, B., Chen, M., & Conte, M. S. (2017). Aspirin-triggered resolvin D1 attenuates PDGF-induced vascular smooth muscle cell migration via the cyclic adenosine monophosphate/protein kinase A (cAMP/PKA) pathway. *PloS one*, 12(3), e0174936. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0174936>
- Nunes, M., Beaton, A., Acquatella, H., Bern, C., Bolger, A. F., Echeverría, L. E., Dutra, W. O., Gascon, J., Morillo, C. A., Oliveira-Filho, J., Ribeiro, A., Marin-Neto, J. A., & American Heart Association Rheumatic Fever, Endocarditis and Kawasaki Disease Committee of the Council on Cardiovascular Disease in the Young; Council on Cardiovascular and Stroke Nursing; and Stroke Council (2018). Chagas Cardiomyopathy: An Update of Current Clinical Knowledge and Management: A Scientific Statement From the American Heart Association. *Circulation*, 138(12), e169–e209. <https://doi.org/10.1161/CIR.0000000000000599>
- Nunes, J., Andrieux, P., Brochet, P., Almeida, R. R., Kitano, E., Honda, A. K., Iwai, L. K., Andrade-Silva, D., Goudenège, D., Alcântara Silva, K. D., Vieira, R. S., Levy, D., Bydlowski, S. P., Gallardo, F., Torres, M., Bocchi, E. A., Mano, M., Santos, R., Bacal, F., Pomerantzeff, P., Cunha-Neto, E. (2021). Co-Exposure of Cardiomyocytes to IFN γ and TNF α Induces Mitochondrial Dysfunction and Nitro-Oxidative Stress: Implications for

- the Pathogenesis of Chronic Chagas Disease Cardiomyopathy. *Frontiers in immunology*, 12, 755862. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2021.755862>
- Olivares-Silva, F., De Gregorio, N., Espitia-Corredor, J., Espinoza, C., Vivar, R., Silva, D., Osorio, J. M., Lavandero, S., Peiró, C., Sánchez-Ferrer, C., & Díaz-Araya, G. (2021). Resolvin-D1 attenuation of angiotensin II-induced cardiac inflammation in mice is associated with prevention of cardiac remodeling and hypertension. *Biochimica et biophysica acta. Molecular basis of disease*, 1867(12), 166241. <https://doi.org/10.1016/j.bbadis.2021.166241>
- Ogata, H., Teixeira, M. M., Sousa, R. C., Silva, M. V., Correia, D., Rodrigues Junior, V., Levy, B. D., & Rogério, A. (2016). Effects of aspirin-triggered resolvin D1 on peripheral blood mononuclear cells from patients with Chagas' heart disease. *European journal of pharmacology*, 777, 26–32. <https://doi.org/10.1016/j.ejphar.2016.02.058>
- Pádua, T. A., Torres, N. D., Candéa, A., Costa, M., Silva, J. D., Silva-Filho, J. L., Costa, F., Rocco, P., Souza, M. C., & Henriques, M. G. (2018). Therapeutic effect of Lipoxin A4 in malaria-induced acute lung injury. *Journal of leukocyte biology*, 103(4), 657–670. <https://doi.org/10.1002/JLB.3A1016-435RRR>
- PAHO (2018, 30 mayo) Enfermedad de Chagas en las Américas: una revisión de la situación actual de salud pública y su visión para el futuro. Recuperado de: <https://www.paho.org/es/documentos/enfermedad-chagas-americas-revision-situacion-actual-salud-publica-su-vision-para-futuro>
- Park, J., Langmead, C. J., & Riddy, D. M. (2020). New Advances in Targeting the Resolution of Inflammation: Implications for Specialized Pro-Resolving Mediator GPCR Drug Discovery. *ACS pharmacology & translational science*, 3(1), 88–106. <https://doi.org/10.1021/acsptsci.9b00075>
- Pavanelli, W. R., Gutierrez, F. R., Mariano, F. S., Prado, C. M., Ferreira, B. R., Teixeira, M. M., Canetti, C., Rossi, M. A., Cunha, F. Q., & Silva, J. S. (2010). 5-lipoxygenase is a key determinant of acute myocardial inflammation and mortality during *Trypanosoma cruzi* infection. *Microbes and infection*, 12(8-9), 587–597. <https://doi.org/10.1016/j.micinf.2010.03.016>

- Pérez-Mazliah, D., Ward, A. I., & Lewis, M. D. (2021). Host-parasite dynamics in Chagas disease from systemic to hyper-local scales. *Parasite immunology*, 43(2), e12786. <https://doi.org/10.1111/pim.12786>
- Pérez-Molina, J. A., & Molina, I. (2018). Chagas disease. *Lancet* (London, England), 391(10115), 82–94. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(17\)31612-4](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(17)31612-4)
- Petersen, C. A., & Burleigh, B. A. (2003). Role for interleukin-1 beta in Trypanosoma cruzi-induced cardiomyocyte hypertrophy. *Infection and immunity*, 71(8), 4441–4447. <https://doi.org/10.1128/IAI.71.8.4441-4447.2003>
- Prata A. (2001). Clinical and epidemiological aspects of Chagas disease. *The Lancet. Infectious diseases*, 1(2), 92–100. [https://doi.org/10.1016/S1473-3099\(01\)00065-2](https://doi.org/10.1016/S1473-3099(01)00065-2)
- Pirault, J., & Bäck, M. (2018). Lipoxin and Resolvin Receptors Transducing the Resolution of Inflammation in Cardiovascular Disease. *Frontiers in pharmacology*, 9, 1273. <https://doi.org/10.3389/fphar.2018.01273>
- Rajão, M. A., Furtado, C., Alves, C. L., Passos-Silva, D. G., de Moura, M. B., Schamber-Reis, B. L., Kunrath-Lima, M., Zuma, A. A., Vieira-da-Rocha, J. P., Garcia, J. B., Mendes, I. C., Pena, S. D., Macedo, A. M., Franco, G. R., de Souza-Pinto, N. C., de Medeiros, M. H., Cruz, A. K., Motta, M. C., Teixeira, S. M., & Machado, C. R. (2014). Unveiling benznidazole's mechanism of action through overexpression of DNA repair proteins in Trypanosoma cruzi. *Environmental and molecular mutagenesis*, 55(4), 309–321. <https://doi.org/10.1002/em.21839>
- Rassi, A., Jr, Rassi, A., & Little, W. C. (2000). Chagas' heart disease. *Clinical cardiology*, 23(12), 883–889. <https://doi.org/10.1002/clc.4960231205>
- Rassi, A., Jr, Rassi, A., & Marin-Neto, J. A. (2010). Chagas disease. *Lancet* (London, England), 375(9723), 1388–1402. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(10\)60061-X](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(10)60061-X)
- Rassi, A., Jr, Marin, J. A., Neto, & Rassi, A. (2017). Chronic Chagas cardiomyopathy: a review of the main pathogenic mechanisms and the efficacy of aetiological treatment following the Benznidazole Evaluation for Interrupting Trypanosomiasis (BENEFIT) trial.

Memorias do Instituto Oswaldo Cruz, 112(3), 224–235. <https://doi.org/10.1590/0074-02760160334>

Recchiuti, A., Krishnamoorthy, S., Fredman, G., Chiang, N., & Serhan, C. N. (2011). MicroRNAs in resolution of acute inflammation: identification of novel resolvin D1-miRNA circuits. *FASEB journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology*, 25(2), 544–560. <https://doi.org/10.1096/fj.10-1695997>

Recchiuti A. (2013). Resolvin D1 and its GPCRs in resolution circuits of inflammation. *Prostaglandins & other lipid mediators*, 107, 64–76. <https://doi.org/10.1016/j.prostaglandins.2013.02.004>

Reed, S. G., Brownell, C. E., Russo, D. M., Silva, J. S., Grabstein, K. H., & Morrissey, P. J. (1994). IL-10 mediates susceptibility to *Trypanosoma cruzi* infection. *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)*, 153(7), 3135–3140.

Reifenberg, K., Lehr, H. A., Torzewski, M., Steige, G., Wiese, E., Küpper, I., Becker, C., Ott, S., Nusser, P., Yamamura, K., Rechtsteiner, G., Warger, T., Pautz, A., Kleinert, H., Schmidt, A., Pieske, B., Wenzel, P., Münzel, T., & Löhler, J. (2007). Interferon-gamma induces chronic active myocarditis and cardiomyopathy in transgenic mice. *The American journal of pathology*, 171(2), 463–472. <https://doi.org/10.2353/ajpath.2007.060906>

Reis, D. D., Jones, E. M., Tostes, S., Jr, Lopes, E. R., Gazzinelli, G., Colley, D. G., & McCurley, T. L. (1993). Characterization of inflammatory infiltrates in chronic chagasic myocardial lesions: presence of tumor necrosis factor-alpha+ cells and dominance of granzyme A+, CD8+ lymphocytes. *The American journal of tropical medicine and hygiene*, 48(5), 637–644. <https://doi.org/10.4269/ajtmh.1993.48.637>

Reyes, A. C., & Rosales, J. L. (2019). *Trypanosoma cruzi* Infection: Mechanisms of Evasion of Immune Response. In (Ed.), *Biology of Trypanosoma cruzi*. IntechOpen. <https://doi.org/10.5772/intechopen.84359>

Ribeiro, C. M., Budni, P., Pedrosa, R. C., Farias, M. S., Parisotto, E. B., Dalmarco, E. M., Fröde, T. S., Oliveira-Silva, D., Colepicolo, P., & Filho, D. W. (2010). Antioxidant therapy attenuates oxidative insult caused by benzonidazole in chronic Chagas' heart

- disease. *International journal of cardiology*, 145(1), 27–33. <https://doi.org/10.1016/j.ijcard.2009.06.033>
- Roffê, E., Rothfuchs, A. G., Santiago, H. C., Marino, A. P., Ribeiro-Gomes, F. L., Eckhaus, M., Antonelli, L. R., & Murphy, P. M. (2012). IL-10 limits parasite burden and protects against fatal myocarditis in a mouse model of *Trypanosoma cruzi* infection. *Journal of immunology* (Baltimore, Md.: 1950), 188(2), 649–660. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.1003845>
- Ronco, M. T., Manarin, R., Francés, D., Serra, E., Revelli, S., & Carnovale, C. (2011). Benznidazole treatment attenuates liver NFκB activity and MAPK in a cecal ligation and puncture model of sepsis. *Molecular immunology*, 48(6-7), 867–873. <https://doi.org/10.1016/j.molimm.2010.12.021>
- Rymut N, Heinz J, Sadhu S, Hosseini Z, Riley CO, Marinello M, Maloney J, MacNamara KC, Spite M, Fredman G. Resolvin D1 promotes efferocytosis in aging by limiting senescent cell-induced MerTK cleavage. *FASEB J*. 2020 Jan;34(1):597-609. doi: 10.1096/fj.201902126R. Epub 2019 Nov 26. PMID: 31914705; PMCID: PMC6956736.
- Salas-Hernández, A., Espinoza-Pérez, C., Vivar, R., Espitia-Corredor, J., Lillo, J., Parra-Flores, P., Sánchez-Ferrer, C. F., Peiró, C., & Díaz-Araya, G. (2021). Resolvin D1 and E1 promote resolution of inflammation in rat cardiac fibroblast in vitro. *Molecular biology reports*, 48(1), 57–66. <https://doi.org/10.1007/s11033-020-06133-8>
- Salles, G., Xavier, S., Sousa, A., Hasslocher-Moreno, A., & Cardoso, C. (2003). Prognostic value of QT interval parameters for mortality risk stratification in Chagas' disease: results of a long-term follow-up study. *Circulation*, 108(3), 305–312. <https://doi.org/10.1161/01.CIR.0000079174.13444.9C>
- Schmitz Nunes, V., Rogério, A. P., & Abrahão, O., Jr (2020). Insights into the Activation Mechanism of the ALX/FPR2 Receptor. *The journal of physical chemistry letters*, 11(21), 8952–8957. <https://doi.org/10.1021/acs.jpcclett.0c02052>
- Sergeeva, I. A., & Christoffels, V. M. (2013). Regulation of expression of atrial and brain natriuretic peptide, biomarkers for heart development and disease. *Biochimica et biophysica acta*, 1832(12), 2403–2413. <https://doi.org/10.1016/j.bbadis.2013.07.003>

- Serhan C. N. (2014). Pro-resolving lipid mediators are leads for resolution physiology. *Nature*, 510(7503), 92–101. <https://doi.org/10.1038/nature13479>
- Serhan, C. N., Chiang, N., Dalli, J., & Levy, B. D. (2014). Lipid mediators in the resolution of inflammation. *Cold Spring Harbor perspectives in biology*, 7(2), a016311. <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a016311>
- Serhan, C. N., & Levy, B. D. (2018). Resolvins in inflammation: emergence of the pro-resolving superfamily of mediators. *The Journal of clinical investigation*, 128(7), 2657–2669. <https://doi.org/10.1172/JCI97943>
- Sousa, G. R., Gomes, J. A., Fares, R. C., Damásio, M. P., Chaves, A. T., Ferreira, K. S., Nunes, M. C., Medeiros, N. I., Valente, V. A., Corrêa-Oliveira, R., & Rocha, M. O. (2014). Plasma cytokine expression is associated with cardiac morbidity in chagas disease. *PloS one*, 9(3), e87082. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0087082>
- Sun, Y. P., Oh, S. F., Uddin, J., Yang, R., Gotlinger, K., Campbell, E., Colgan, S. P., Petasis, N. A., & Serhan, C. N. (2007). Resolvin D1 and its aspirin-triggered 17R epimer. Stereochemical assignments, anti-inflammatory properties, and enzymatic inactivation. *The Journal of biological chemistry*, 282(13), 9323–9334. <https://doi.org/10.1074/jbc.M609212200>
- Tanowitz, H. B., Machado, F. S., Spray, D. C., Friedman, J. M., Weiss, O. S., Lora, J. N., Nagajyothi, J., Moraes, D. N., Garg, N. J., Nunes, M. C., & Ribeiro, A. L. (2015). Developments in the management of Chagas cardiomyopathy. *Expert review of cardiovascular therapy*, 13(12), 1393–1409. <https://doi.org/10.1586/14779072.2015.1103648>
- Teixeira, A. R., Hecht, M. M., Guimaro, M. C., Sousa, A. O., & Nitz, N. (2011). Pathogenesis of chagas' disease: parasite persistence and autoimmunity. *Clinical microbiology reviews*, 24(3), 592–630. <https://doi.org/10.1128/CMR.00063-10>
- Tonelli, R. R., Torrecilhas, A. C., Jacysyn, J. F., Juliano, M. A., Colli, W., & Alves, M. J. (2011). In vivo infection by *Trypanosoma cruzi*: the conserved FLY domain of the gp85/trans-sialidase family potentiates host infection. *Parasitology*, 138(4), 481–492. <https://doi.org/10.1017/S0031182010001411>

- Tourki, B., Kain, V., Pullen, A. B., Norris, P. C., Patel, N., Arora, P., Leroy, X., Serhan, C. N., & Halade, G. V. (2020). Lack of resolution sensor drives age-related cardiometabolic and cardiorenal defects and impedes inflammation-resolution in heart failure. *Molecular metabolism*, *31*, 138–149. <https://doi.org/10.1016/j.molmet.2019.10.008>
- Trochine, A., Creek, D. J., Faral-Tello, P., Barrett, M. P., & Robello, C. (2014). Benznidazole biotransformation and multiple targets in *Trypanosoma cruzi* revealed by metabolomics. *PLoS neglected tropical diseases*, *8*(5), e2844. <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0002844>
- Tucci, A. R., Oliveira, F., Jr, Lechuga, G. C., Oliveira, G. M., Eleuterio, A. C., Mesquita, L. B., Farani, P., Britto, C., Moreira, O. C., & Pereira, M. (2020). Role of FAK signaling in chagasic cardiac hypertrophy. *The Brazilian journal of infectious diseases : an official publication of the Brazilian Society of Infectious Diseases*, *24*(5), 386–397. <https://doi.org/10.1016/j.bjid.2020.08.007>
- Tylek, K., Trojan, E., Regulska, M., Lacivita, E., Leopoldo, M., & Basta-Kaim, A. (2021). Formyl peptide receptor 2, as an important target for ligands triggering the inflammatory response regulation: a link to brain pathology. *Pharmacological reports : PR*, *73*(4), 1004–1019. <https://doi.org/10.1007/s43440-021-00271-x>
- Vasconcelos, R. H., Azevedo, E., Diniz, G. T., Cavalcanti, M., de Oliveira, W., Jr, de Morais, C. N., & Gomes, Y. (2015). Interleukin-10 and tumour necrosis factor-alpha serum levels in chronic Chagas disease patients. *Parasite immunology*, *37*(7), 376–379. <https://doi.org/10.1111/pim.12183>
- Viodé, C., Bettache, N., Cenas, N., Krauth-Siegel, R. L., Chauvière, G., Bakalara, N., & Périé, J. (1999). Enzymatic reduction studies of nitroheterocycles. *Biochemical pharmacology*, *57*(5), 549–557. [https://doi.org/10.1016/s0006-2952\(98\)00324-4](https://doi.org/10.1016/s0006-2952(98)00324-4)
- Wan, X., Wen, J. J., Koo, S. J., Liang, L. Y., & Garg, N. J. (2016). SIRT1-PGC1 α -NF κ B Pathway of Oxidative and Inflammatory Stress during *Trypanosoma cruzi* Infection: Benefits of SIRT1-Targeted Therapy in Improving Heart Function in Chagas Disease. *PLoS pathogens*, *12*(10), e1005954. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1005954>

- Wang, C. S., Maruyama, C. L., Easley, J. T., Trump, B. G., & Baker, O. J. (2017). AT-RvD1 Promotes Resolution of Inflammation in NOD/ShiLtJ mice. *Scientific reports*, 7, 45525. <https://doi.org/10.1038/srep45525>
- Wang, C. S., & Baker, O. J. (2018). The G-Protein-Coupled Receptor ALX/Fpr2 Regulates Adaptive Immune Responses in Mouse Submandibular Glands. *The American journal of pathology*, 188(7), 1555–1562. <https://doi.org/10.1016/j.ajpath.2018.04.003>
- WHO (2020, 1 abril). Chagas disease (also known as American trypanosomiasis). Recuperado de: [https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/chagas-disease-\(american-trypanosomiasis\)](https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/chagas-disease-(american-trypanosomiasis)).
- Wilkinson, S. R., & Kelly, J. M. (2009). Trypanocidal drugs: mechanisms, resistance and new targets. *Expert reviews in molecular medicine*, 11, e31. <https://doi.org/10.1017/S1462399409001252>
- Wilkinson, S. R., Bot, C., Kelly, J. M., & Hall, B. S. (2011). Trypanocidal activity of nitroaromatic prodrugs: current treatments and future perspectives. *Current topics in medicinal chemistry*, 11(16), 2072–2084. <https://doi.org/10.2174/156802611796575894>
- Zhuang, Y., Liu, H., Edward Zhou, X., Kumar Verma, R., de Waal, P. W., Jang, W., Xu, T. H., Wang, L., Meng, X., Zhao, G., Kang, Y., Melcher, K., Fan, H., Lambert, N. A., Eric Xu, H., & Zhang, C. (2020). Structure of formylpeptide receptor 2-G_i complex reveals insights into ligand recognition and signaling. *Nature communications*, 11(1), 885. <https://doi.org/10.1038/s41467-020-14728-9>

9. PUBLICACIONES DERIVADAS DE LA TESIS

9.1 ARTÍCULOS

- **Carrillo, I.**, Rabelo, R., Barbosa, C., Rates, M., Fuentes-Retamal, S., González-Herrera, F., Guzmán-Rivera, D., Quintero, H., Kemmerling, U., Castillo, C., Machado, F. S., Díaz-Araya, G., & Maya, J. D. (2021). Aspirin-triggered resolvin D1 reduces parasitic cardiac load by decreasing inflammation in a murine model of early chronic Chagas disease. *PLoS neglected tropical diseases*, 15(11), e0009978. <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0009978>
- Quintero-Pertuz H, Veas-Albornoz R, **Carrillo I**, González-Herrera F, Lapier M, Carbonó-Delahoz E, Del Olmo E, Feliciano AS, Kemmerling U, Olea-Azar C, Delporte C, Maya JD. (2022). Trypanocidal effect of alcoholic extract of *Castanedia santamartensis* (Asteraceae) leaves is based on altered mitochondrial function. *Biomed Pharmacother.* 148:112761. doi: 10.1016/j.biopha.2022.112761.
- Campos-Estrada C, González-Herrera F, Greif G, **Carrillo I**, Guzmán-Rivera D, Liempi A, Robello C, Kemmerling U, Castillo C, Maya JD. (2020). Notch receptor expression in *Trypanosoma cruzi*-infected human umbilical vein endothelial cells treated with benznidazole or simvastatin revealed by microarray analysis. *Cell Biol Int.* 44(5):1112-1123. doi: 10.1002/cbin.11308. Epub 2020 Jan 22. PMID: 31943572.
- Guzmán-Rivera, D.; Liempi, A.; González-Herrera, F.; Fuentes, S.; **Carrillo, I**; Abarca, P.; Castillo, C., Kemmerling, K.; Pesce, B.; Juan Diego Maya, J.D. Simvastatin improves cardiac function through Notch 1 activation in BALB/c mice with Chronic Chagas Cardiomyopathy. (2020). *Antimicrob Agents Chemother.* 22;64(8):e02141-19. doi: 10.1128/AAC.02141-19.

9.2 PRESENTACIONES A CONGRESOS INTERNACIONALES

- **I. Carrillo**, R. Rabelo, D. Guzman-Rivera, F. González-Herrera, H. Quintero, U. Kemmerling, F. S. Machado, G. Díaz-Araya, J. D. Maya. “Therapeutic Effect Of Aspirin-Triggered Resolvin D1 In A Murine Model Of Chronic Chagas Cardiomyopathy”. *World Microbe Forum.* 20-24 Junio 2021. Congreso Online.

- **Ileana Carrillo**, Rayane Rabelo, Mariana Rates, Cesar Barboza, Allyson Cramer, Daniela Guzmán-Rivera, Fabiola González-Herrera, Juan Diego Maya, Fabiana Machado. Role of FPR2 receptor in the infection of C57BL/6 mice with *Trypanosoma cruzi*. 5th Annual meeting of the post-graduation program in health sciences: Infectious diseases and tropical medicine. 29 de Noviembre de 2019. Belo Horizonte, Brasil.

9.3 PRESENTACIONES A CONGRESOS NACIONALES

- **Ileana Carrillo**, Rayane Rabelo, Sebastián Fuentes-Retamal, Fabiola González-Herrera, Daniela Guzmán-Rivera, Helena Quintero, Fabiana S. Machado, Guillermo Díaz-Araya, Juan Diego Maya. “Effect of Aspirin-Triggered Resolvin D1 as pharmacological therapy in a murine model of Chronic Chagasic Cardiomyopathy”. Congreso de la Sociedad de Farmacología de Chile, 01 al 03 de Diciembre de 2021. Presentación oral.
- **Ileana Carrillo**, Rayane Rabelo, Daniela Guzmán-Rivera, Fabiola González-Herrera, Helena Quintero, Fabiana S. Machado, Guillermo Díaz-Araya, Juan Diego Maya. “Efecto terapéutico de AT-RvD1 durante la infección crónica con *T. cruzi*: Modelo murino de Cardiomiopatía Chagásica Crónica”. I Congreso de Estudiantes de Posgrado Campus Dra. Eloísa Díaz, Universidad de Chile realizado el 10 y 11 de diciembre del 2020.
- **Ileana Carrillo**, Rayane Rabelo, Mariana Rates, Daniela Guzmán-Rivera, Fabiola González-Herrera, Helena Quintero, Guillermo Díaz-Araya, Juan Diego Maya. “Estudio de AT-RvD1 como terapia farmacológica en la infección crónica con *T. cruzi*: modelo murino de Cardiomiopatía Chagásica Crónica.” Congreso Digital de la Sociedad de Microbiología de Chile, realizado del 2 al 4 de diciembre del 2020.