

UNIVERSIDAD DE CHILE

FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS Y FARMACÉUTICAS



**EFFECTO DE LA INHIBICIÓN DE RHO KINASA POR
ATORVASTATINA SOBRE LA POLARIZACIÓN DE
MACRÓFAGOS INFECTADOS CON *TRYPANOSOMA CRUZI***

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

FABIOLA LORENA GONZÁLEZ HERRERA

Directores de Tesis

Dr. Juan Diego Maya Arango y Dr. Raúl Fabián Vivar Sánchez

Santiago-CHILE

Diciembre 2022

UNIVERSIDAD DE CHILE
FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS Y FARMACÉUTICAS

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 la candidata

FABIOLA LORENA GONZÁLEZ HERRERA

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

Director de Tesis:

Dr. Juan Diego Maya A.

Co-director de Tesis:

Dr. Raúl Vivar S.

Comisión Evaluadora de Tesis:

Dr. Guillermo Díaz A.

Dra. Paulina Donoso L.

Dr. Emilio Herrera V.

Dr. Hugo Verdejo P.

*A mis padres, Sandra y Claudio
porque todo lo que soy se lo debo a su amor, trabajo, y dedicación.*

*A mi hermano, Ignacio
por su inmensurable e incondicional amor.*

AGRADECIMIENTOS

En este largo proceso parto por agradecer a mis directores de Tesis, Dr. Juan Diego Maya y Dr. Raúl Vivar, por aceptarme como alumna, confiar en mí, y guiarme. A su vez, agradezco a mi comisión evaluadora por su buena disposición y sus comentarios constructivos.

A mis padres Sandra y Claudio, y mi hermano Ignacio, por el amor y preocupación que siento a pesar de la distancia, y a toda mi familia incluyendo tíos, primos y abuela, porque a pesar de no entender mucho lo que hago, siempre estuvieron atentos a mi progreso, y se mostraron orgullosos de mis logros.

Al Rena (Achún) por su amor y apoyo incondicional, y por ser un pilar fundamental en mi vida, y también a su familia, por acogerme y acompañarme a lo largo de todos estos años.

A mis amigos del laboratorio Dany, Ile, Helen, Michel, Meibel, Rabdul, Reni G y Seba, por aconsejarme, acompañarme y animarme en momentos de frustración y por celebrar conmigo los momentos de felicidad. También agradezco a mis compañeros del Doctorado, por el apoyo que nos hemos brindado entre todos desde el comienzo. Gracias también a les Chapitas, por el amor, los consejos y los buenos momentos. No puedo dejar de mencionar a las chicas Epi del HRR, por el cariño y la buena onda, en especial a Ivette, por darme todas las facilidades que necesité para terminar mis estudios. Mención especial al equipo alto costo, por adoptarme y quererme.

Finally, I am deeply grateful to Dr. Anne Ridley, for receiving me in her laboratory, for trusting me, teaching me, and for allowing me to live this beautiful experience. Thanks also to Natasha and Camilla, your help and support was essential in this process.

FINANCIAMIENTO

La presente tesis contó con el apoyo financiero de la Agencia Nacional de Investigación y Desarrollo (ANID) mediante los proyectos FONDECYT Regular N°1210359 (JDM) y Beca Doctorado Nacional N°21170427. La realización de esta tesis fue posible también gracias a la Beca de Arancel, otorgada por la Facultad de Ciencias Químicas y Farmacéuticas.

La divulgación de los resultados derivados de esta tesis fue financiada por la Beca Gastos Operacionales N°21170427, otorgada por la Agencia Nacional de Investigación y Desarrollo (ANID), y por la Beca de Asistencia a Congreso, otorgada por la Facultad de Ciencias Químicas y Farmacéuticas.

El desarrollo experimental de este trabajo se realizó en el Laboratorio de Bioquímica, Metabolismo y Resistencia a Fármacos, del Instituto de Ciencias Biomédicas, Facultad de Medicina, Universidad de Chile, Chile, y en la *School of Cellular and Molecular Medicine, Biomedical Sciences Building, University of Bristol, Bristol, United Kingdom*, gracias a la Beca de Pasantía N°21170427, otorgada por la Agencia Nacional de Investigación y Desarrollo (ANID).

ÍNDICE GENERAL

Abreviaturas	12
Resumen	15
Abstract	18
Introducción.....	21
1. Enfermedad de Chagas.....	21
1.1. Epidemiología de la EC.....	22
1.2. Ciclo de vida de <i>T. cruzi</i>	22
1.3. Manifestaciones clínicas de la EC	23
1.4. Diagnóstico de la EC	26
1.5. Tratamiento farmacológico de la EC.....	26
2. Cardiopatía Chagásica Crónica (CCC).....	27
2.1. Manifestaciones clínicas de la CCC.....	28
2.2. Tratamiento de la CCC	29
2.3. Patogénesis de la CCC.....	29
3. Inmunidad en la CCC	30
3.1. Macrófagos	31
3.2. Polarización de macrófagos en la CCC	33
3.3. Disfunción endotelial en la CCC	34
4. Vía Rho/Rho Kinasa (ROCK)	35
4.1. Rol de ROCK en la polarización de macrófagos.....	37
4.2. Rol de ROCK en la infección con <i>T. cruzi</i>	38
5. Estatinas.....	38
Hipótesis.....	42

Objetivo general	42
Objetivos específicos	42
Materiales y métodos	43
1. Cultivo celular	43
2. Infección con <i>Trypanosoma cruzi</i>	44
3. Tratamientos.....	44
4. Adhesión de células endoteliales	44
5. Modelo animal	44
6. Inmunohistoquímica de tejido cardiaco	45
7. Western Blot.....	45
8. RT-qPCR.....	46
9. Extracción de ADN plasmidial	47
10. PCR para subclonamiento.....	47
11. Digestión con Enzimas de Restricción	49
12. Electroforesis en gel de agarosa	49
13. Extracción de ADN desde gel de agarosa.....	50
14. Ligación de ADN.....	50
15. Transformación de <i>E. coli</i>	50
16. Secuenciación	50
17. Producción de Lentivirus y Transducción de células U937	51
18. Análisis estadístico	51
Resultados	53
1. <i>T. cruzi</i> activa a ROCK en macrófagos humanos vía TLR4	53

2. ROCK media la activación del factor nuclear kappa B (NF-κB) inducida por <i>T. cruzi</i>	56
3. ROCK está implicado en la polarización de macrófagos inducida por <i>T. cruzi</i>	57
4. Atorvastatina inhibe la activación de ROCK inducida por <i>T. cruzi</i>	60
5. Atorvastatina induce un cambio en la polarización de macrófagos infectados con <i>T. cruzi</i>	62
6. Expresión constitutiva de ROCK-1 y ROCK-2 en macrófagos humanos	64
7. La inhibición de ROCK cumple un rol importante en el efecto antiinflamatorio de atorvastatina inducido en macrófagos infectados con <i>T. cruzi</i>	73
8. La secreción de citoquinas inducida por atorvastatina en macrófagos infectados con <i>T. cruzi</i> reduce la activación de células endoteliales microvasculares cardiacas humanas.	78
9. El tratamiento con simvastatina reduce la expresión y activación de ROCK y cambia el perfil de citoquinas en tejido cardiaco de ratones con CCC.....	80
Discusión.....	83
Conclusiones.....	96
Referencias	97
Publicaciones derivadas de la tesis.....	111
Otras publicaciones en periodo de doctorado	111
Presentaciones en congresos internacionales	113
Presentaciones en congresos nacionales	114
Becas y premios en periodo de doctorado	115

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Ciclo de vida de <i>T. cruzi</i>	24
Figura 2. Curso de la infección con <i>T. cruzi</i>	25
Figura 3. Progresión de la inmunidad en la EC.....	31
Figura 4. Polarización de macrófagos.....	33
Figura 5. Estructura y mecanismos de activación de ROCK-1 y ROCK-2.....	36
Figura 6. Vía Rho/ROCK.....	37
Figura 7. Inhibición de Rho/ROCK por estatinas.....	40
Figura 8. Diferenciación de monocitos U937 a macrófagos con PMA.....	43
Figura 9. Activación y expresión ROCK en macrófagos infectados con <i>T. cruzi</i> ...	55
Figura 10. La inhibición de ROCK impide la fosforilación y localización nuclear de P65 en macrófagos infectados con <i>T. cruzi</i>	57
Figura 11. La inhibición de ROCK produce un cambio en la síntesis de citoquinas en macrófagos infectados con <i>T. cruzi</i>	59
Figura 12. Atorvastatina disminuye la activación y expresión de ROCK en macrófagos infectados con <i>T. cruzi</i>	61
Figura 13. Atorvastatina cambia la expresión de marcadores M1 y M2 en macrófagos infectados con <i>T. cruzi</i>	63
Figura 14. Esquema del plasmidio pSEW.....	65
Figura 15. Esquema de ROCK-1 y ROCK-2.....	66
Figura 16. Esquema de subclonamiento de ROCK-1 desde pCAG hacia pSEW..	67
Figura 17. Geles de ROCK-1.....	68

Figura 18. Esquema de subclonamiento de ROCK-2 desde pXJ40-HA-ROCK-2 hacia pSEW.....	69
Figura 19. Geles de ROCK-2..	70
Figura 20. Confirmación de expresión de proteínas en células U937.	71
Figura 21. Estabilidad de la transducción de células U937.	72
Figura 22. La inhibición en la expresión y secreción de marcadores M1 por atorvastatina es prevenido en células expresando ROCK-1 y ROCK-2 constitutivamente activos.	74
Figura 23. Atorvastatina modula la expresión, pero no la secreción de marcadores M2.	75
Figura 24. La expresión constitutiva de ROCK-1 y ROCK-2 previene efecto antiinflamatorio de atorvastatina en macrófagos incubados con <i>T. cruzi</i>	76
Figura 25. La expresión de ROCK constitutivamente activo previene el efecto antiinflamatorio de atorvastatina en macrófagos incubados con <i>T. cruzi</i>	77
Figura 26. El medio condicionado de macrófagos tratados con atorvastatina e infectados con <i>T. cruzi</i> disminuye la activación de células endoteliales microvasculares cardíacas humanas.	79
Figura 27. El tratamiento con simvastatina reduce la expresión de ROCK y de citoquinas proinflamatorias en tejido cardíaco de ratones con CCC.	82
Figura 28. Resumen y modelo propuesto.	95

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Anticuerpos primarios y secundarios utilizados en Western Blot.	45
Tabla 2. Partidores utilizados para qPCR	46
Tabla 3. Partidores utilizados para subclonamiento de ROCK-1 y ROCK-2	48
Tabla 4. Ciclos de PCR para subclonamiento de ROCK-1	48
Tabla 5. Componentes del mix de PCR para ROCK-2.....	48
Tabla 6. Ciclos de PCR para subclonamiento de ROCK-2	49
Tabla 7. Secuencia de partidores para secuenciación de plasmidios lentivirales creados	50

ABREVIATURAS

ADN	Ácido desoxirribonucleico
Akt	Proteína quinasa B
Arg-1	Arginasa-1
ARN	Ácido ribonucleico
ARNm	Ácido ribonucleico mensajero
Bz	Benznidazol
CAM	Molécula de adhesión celular
CCC	Cardiomiopatía chagásica crónica
CCR	Región de hélice superenrollada
CE	Célula endotelial
CMC	Carboximetilcelulosa
CMIA	Quimioluminiscencia
CRD	Dominio rico en cisteína
CSF	Factor estimulador de colonias
DTU	Unidades discretas de tipificación
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
EC	Enfermedad de Chagas
ECG	Electrocardiograma
ELISA	Ensayo por inmunoabsorción ligado a enzimas
ERM	Familia exrina/radixina/moesina
FDA	Administración de Alimentos y Medicamentos
GAP	Proteína activadora de GTPasa
GAPDH	Gliceraldehído 3-fosfato deshidrogenasa
GDI	Inhibidor de la disociación de nucleótidos de guanosina
GDP	Guanosín difosfato
GEF	Factor intercambiador de nucleótidos de guanosina
GGPP	Pirofosfato de geranilo
GM-CSF	Factor estimulador de granulocitos y macrófagos
GTP	Guanosín trifosfato
HAI	Ensayo de inhibición de la hemaglutinación

HMG-CoA	3-hidroxi-3-metilglutaril-coenzima A
HMVEC-C	Célula endotelial microvascular cardiaca humana
HRP	Peroxidasa de rabanito
ICAM	Molécula de adhesión intercelular
ICT	Inmunocromatografía
iECA	Inhibidor de la enzima convertidora de angiotensina
IFN	Interferón
IgG	Inmunoglobulina G
IgM	Inmunoglobulina M
IIF	Inmunofluorescencia indirecta
IKK β	Inhibidor del factor nuclear kappa-B quinasa subunidad beta
IL	Interleuquina
iNOS	Óxido nítrico sintasa inducible
IRF3	Factor regulador de interferón 3
LIMK	LIM Kinasa
LPS	Lipopolisacárido
M1	Macrófagos clásicamente activados
M2	Macrófagos alternativamente activados
MLC	Cadena liviana de la miosina
MLCK	Quinasa de la cadena ligera de la miosina
M-MLV	Transcriptasa inversa del virus de la leucemia murina de Moloney
MOI	Multiplicidad de infección
mTORC1	Blanco de mamífero del complejo de rapamicina 1
MyD88	Proteína de respuesta primaria de diferenciación mieloides 88
MYPT	Fosfatasa de la cadena liviana de la miosina
NFX	Nifurtimox
NF- κ B	Factor nuclear kappa B
NK	Células asesinas naturales
NLRP3	Dominio 3 de pirina de la familia NLR
NO	Óxido nítrico
NTR-I	Nitrorreductasa uno

OMS	Organización Mundial de la Salud
PAMPs	Patrones moleculares asociados a patógenos
PBS	Tampón fosfato salino
PCR	Reacción en cadena de la polimerasa
PECAM	Molécula de adhesión de células endoteliales de plaquetas
PH	Dominio de Pleckstrina
PKA	Proteína quinasa A
PKC	Proteína quinasa C
PKN	Proteína quinasa N
PMA	Forbol-12-miristato-13-acetato
qPCR	Reacción en cadena de la polimerasa cuantitativa
RBD	Dominio de unión a Rho
ROCK	Rho Kinasa
ROS	Especies reactivas de oxígeno
Rpm	Revoluciones por minuto
RT	Transcripción inversa
SFB	Suero Fetal Bovino
siARN	ARN pequeño de interferencia
STAT1	Transductor de señal y activador de la transcripción
<i>T. cruzi</i>	<i>Trypanosoma cruzi</i>
<i>T. infestans</i>	<i>Triatoma infestans</i>
TBS	Tampón Tris salino
TGF	Factor de crecimiento transformante
TLR	Receptor tipo toll
TNF	Factor de necrosis tumoral
TRIF	Interferón β inductor de adaptador que contiene el dominio TIR
VCAM	Molécula de adhesión vascular
VEGF	Factor de crecimiento endotelial vascular
α -SMA	Alfa actina de musculo liso

RESUMEN

La enfermedad de Chagas (EC) es una enfermedad causada por el protozoo *Trypanosoma cruzi* (*T. cruzi*). La fase crónica de la enfermedad se manifiesta principalmente como enfermedad gastrointestinal o cardiomiopatía chagásica crónica (CCC), que es la forma más seria de la enfermedad. El tratamiento actual de la enfermedad de Chagas es benznidazol, fármaco tripanocida que no disminuye los síntomas de la CCC cuando es administrado en la fase crónica. Debido a esto, se requiere una estrategia farmacológica que prevenga los efectos fisiopatológicos producidos en la CCC. Estudios histológicos de autopsias han revelado que los pacientes con CCC presentan una gran infiltración de macrófagos y consecuente fibrosis. Además, se ha observado que los pacientes con EC crónica asintomáticos tienen niveles altos de citoquinas antiinflamatorias (M2), lo que les protege del daño tisular, mientras que los pacientes con CCC secretan mayormente citoquinas proinflamatorias (M1), las que podrían ser las culpables de la miocarditis crónica. Es más, en ratones, el cambio de fenotipo hacia uno M2 está relacionado con una mejora en la función cardíaca. Además, las citoquinas M1 han demostrado ser causantes de la activación y disfunción endotelial, que conlleva a la formación de focos isquémicos en el tejido cardíaco. Por lo tanto, cambiar el fenotipo de macrófagos M1 proinflamatorios a M2 antiinflamatorios podría ser un mecanismo para prevenir la aparición de los cambios observados en la CCC.

Rho Kinasa (ROCK) es una serina/treonina quinasa activada por la proteína G pequeña RhoA. ROCK tiene 2 isoformas; ROCK-1 y ROCK-2. Estas quinasas están implicadas en la polarización de macrófagos hacia M1, y su inhibición aumenta la población M2. Además, ROCK se ha relacionado con hipertrofia y fibrosis cardíaca en ratones. Por esta razón, ROCK podría ser un blanco farmacológico para el cambio de polarización de macrófagos en pacientes con CCC.

La atorvastatina inhibe a la enzima HMG-CoA reductasa, inhibiendo a su vez la síntesis de isoprenoides importantes en la activación de GTPasas pequeñas como RhoA. El tratamiento con atorvastatina reduce la activación RhoA/ROCK en

leucocitos y cambia la polarización de macrófagos de M1 a M2 en pacientes con aterosclerosis. De esta manera, la inhibición de ROCK por estatinas podría cambiar la polarización de macrófagos y reducir el daño tisular producido en la CCC.

Por lo tanto, en este trabajo se propone que la inhibición de ROCK por atorvastatina promueve una polarización tipo M2 en macrófagos activados por *T. cruzi*, lo que disminuye su adhesión a células endoteliales.

Para demostrar esta hipótesis, se incubaron macrófagos U937 inducidos con PMA con *T. cruzi* a distintos tiempos y se evaluó activación de ROCK por western blot. Para dilucidar la vía de señalización involucrada en la activación de ROCK, se trató con el inhibidor de TLR4, TAK-242, y además se evaluó la activación de la vía NF- κ B por western blot e inmunofluorescencia. El rol de la activación de ROCK en la síntesis de citoquinas M1 y M2 se determinó usando el inhibidor de ROCK, Y27632, midiendo la expresión y secreción de citoquinas mediante RT-qPCR y Multiplex, respectivamente. Luego, se observó el efecto de atorvastatina sobre la activación de ROCK, y la polarización de macrófagos usando marcadores de cada fenotipo por RT-qPCR y Multiplex. Para evaluar la relación entre la inhibición de ROCK-1 o ROCK-2 por atorvastatina y su efecto sobre la polarización, se sobre-expresó ROCK-1 y ROCK-2 constitutivamente activos (CA) en los macrófagos, previo a la infección con *T. cruzi* y al tratamiento con atorvastatina. Finalmente, las citoquinas secretadas por los macrófagos incubados con *T. cruzi* y atorvastatina se cultivaron con células endoteliales microvasculares cardíacas (HMVEC-C) para determinar su efecto en la activación, mediante RT-qPCR de moléculas de adhesión, y sobre la adhesión a monocitos humanos. Este efecto de las estatinas sobre la expresión de ROCK y citoquinas M1 y M2 fue además determinado en tejido cardíaco de ratones con CCC tratado con simvastatina.

Como resultado, se encontró que *T. cruzi* activó a ROCK en macrófagos humanos mediante la activación de TLR4, lo que indujo la activación de NF- κ B. La inhibición de ROCK indujo una disminución de expresión y secreción de las citoquinas M1, un

aumento de la expresión de los marcadores M2, y una disminución de la secreción de los marcadores M2. La relación M1/M2 (marcador de polarización) disminuyó en macrófagos tratados con Y27632. Por otro lado, atorvastatina inhibió la activación de ROCK inducida por *T. cruzi*, cambiando el fenotipo de macrófagos hacia M2, lo que fue prevenido por la expresión de ROCK-1 y ROCK-2 CA. Además, el cambio en el secretoma inducido por atorvastatina disminuyó la activación y adhesión de células endoteliales. Finalmente, los ratones con CCC aumentaron la expresión de ROCK-1, y de citoquinas M1, y disminuyeron la expresión de citoquinas M2, mientras que el tratamiento con simvastatina previno el efecto de CCC, observándose una relación positiva entre ROCK-1 y citoquinas M1, y una relación negativa entre ROCK-1 y citoquinas M2.

ABSTRACT

EFFECT OF RHO KINASE INHIBITION BY ATORVASTATIN ON POLARISATION OF TRYPANOSOMA CRUZI-INFECTED MACROPHAGES

Chagas disease (CD) is caused by the protozoan *Trypanosoma cruzi* (*T. cruzi*). The chronic phase of the disease manifests mainly as gastrointestinal disease or chronic Chagasic cardiomyopathy (CCC), which is the most severe form of the disease. The current treatment for CD is benznidazole, a trypanocidal drug that does not reduce the symptoms of CCC when administered in the chronic phase. Therefore, a new pharmacological strategy is required to prevent the pathophysiological effects that produce CCC. Histological studies of autopsies have revealed that patients with CCC present a significant infiltration of macrophages and subsequent fibrosis. In addition, it has been observed that asymptomatic chronic CD patients have a prevalence of anti-inflammatory cytokines (M2), which protects them from tissue damage. In contrast, patients with CCC secrete mostly proinflammatory cytokines (M1), which could be the cause of chronic myocarditis. In vivo models of CCC have shown that the change in phenotype towards an M2 is related to an improvement in cardiac function. In addition, M1 cytokines have shown to cause endothelial activation and dysfunction, leading to the formation of ischemic foci in cardiac tissue. Therefore, changing the phenotype from proinflammatory M1 macrophages to immunoregulatory M2 could be a mechanism to prevent CCC.

Rho Kinase (ROCK) is a serine/threonine kinase activated by the small G protein RhoA. ROCK has two isoforms: ROCK-1 and ROCK-2. These kinases are involved in the polarization of macrophages towards M1, and their inhibition increases the M2 population. For this reason, ROCK could be a pharmacological target for macrophage polarization change in CCC patients.

Atorvastatin inhibits the HMG-CoA reductase enzyme, inhibiting the synthesis of isoprenoids critical in activating small GTPases such as RhoA. Atorvastatin treatment reduces RhoA/ROCK activation in leukocytes and changes macrophage

polarization from M1 to M2 in patients with atherosclerosis. In addition, ROCK has been linked to cardiac hypertrophy and fibrosis in mice. Thus, ROCK inhibition by statins could change macrophage polarization and reduce tissue damage in CCC.

Therefore, this thesis proposes that the inhibition of ROCK by atorvastatin promotes an M2-type polarization in macrophages activated by *T. cruzi*, which decreases endothelial cell adhesion.

To determine this, PMA-induced U937 macrophages were incubated with *T. cruzi* at different times, and ROCK activation was evaluated by western blot. To elucidate the signaling pathway involved in ROCK activation, cells were treated with the TLR4 inhibitor, TAK-242. The activation of the NF- κ B pathway was also evaluated by western blot and immunofluorescence. The role of ROCK activation in the synthesis of M1 and M2 cytokines was determined using the ROCK inhibitor, Y27632, and measuring cytokine expression and secretion by RT-qPCR and Multiplex, respectively. Then, the effect of atorvastatin on ROCK activation and macrophage polarization was observed using markers of each phenotype by RT-qPCR and Multiplex. To assess the relationship between the inhibition of ROCK-1 or ROCK-2 by atorvastatin and its effect on polarization, constitutively active ROCK-1 and ROCK-2 were overexpressed in macrophages before infection with *T. cruzi* and the atorvastatin treatment. Finally, the cytokines secreted by macrophages incubated with *T. cruzi* and atorvastatin were cultured with cardiac microvascular endothelial cells (HMVEC-C) to determine their effect on activation, using RT-qPCR of adhesion molecules, and on adhesion to monocytes. This effect of statins on the expression of ROCK and M1 and M2 cytokines was also determined in cardiac tissue from CCC mice treated with simvastatin.

T. cruzi activated ROCK in human macrophages by TLR4, which induced NF- κ B activation. ROCK inhibition decreased the expression and secretion of M1 cytokines, increased the expression of M2 markers, and decreased the secretion of M2 markers. The M1/M2 ratio was decreased in macrophages treated with Y27632. On

the other hand, atorvastatin inhibited *T. cruzi*-induced ROCK activation, changing the macrophage phenotype towards M2, which was prevented by constitutive expression of ROCK-1 and ROCK-2. Finally, the change in the macrophage secretome induced by atorvastatin decreased endothelial cell activation and adhesion capacity.

INTRODUCCIÓN

1. Enfermedad de Chagas

En 1908, el director del Instituto Manguinhos de Río de Janeiro, Oswaldo Cruz, envió al médico de 29 años Carlos Chagas a controlar un brote de malaria en Minas Gerais que afectó a trabajadores ferroviarios que estaban construyendo un ferrocarril desde Río de Janeiro hacia la cuenca norte del Amazonas, tarea que nunca se completó. En ese entonces, Carlos Chagas conoció unos chinches conocidos como "barbeiros" que mordían a los humanos en las noches mientras dormían, desde donde detectó protozoos flagelados parecidos a *Trypanosoma minasense*. El parásito fue nombrado *Trypanosoma cruzi*, en honor a Oswaldo Cruz. Luego de algunos estudios en pacientes, en agosto de 1909, Carlos Chagas publicó un estudio completo del ciclo de vida del parásito, describiendo vectores, mecanismos de transmisión y signos clínicos en humanos y animales [1], de la que ha sido la primera y única enfermedad caracterizada completamente por un solo investigador.

La enfermedad de Chagas, o Tripanosomiasis Americana, es una enfermedad parasitaria causada por el protozoo hemoflagelado *Trypanosoma cruzi* (*T. cruzi*), el cual puede ser transmitido por más de 150 especies de insectos hematófagos de la subfamilia Triatominae, más conocidos en Chile como vinchuca. Las vinchucas viven en grietas de casas de barro asociadas a condiciones de pobreza en zonas rurales y periurbanas de toda Latinoamérica. En Chile existen 4 de estos insectos: *Triatoma infestans*, *Mepraia spinolai*, *Mepraia gajardoi* y *Mepraia parapatrica*. De estos cuatro, solo *T. infestans* es doméstico, lo que lo hace responsable de la prevalencia de la enfermedad en el país [2], aunque en Chile, la transmisión vectorial ha estado interrumpida [3]. Además de la transmisión por el vector, la enfermedad de Chagas se puede transmitir de manera congénita, mediante transfusión de sangre, trasplantes de órganos desde pacientes infectados, o a través del consumo de alimentos contaminados con el parásito [4].

1.1. Epidemiología de la EC

La transmisión de *T. cruzi* ocurre predominantemente en áreas rurales de países latinoamericanos. El año 2015, la organización mundial de la Salud (OMS) publicó una actualización de la información epidemiológica de los 21 países de América Latina, donde se reportaron 6 millones de personas infectadas. Argentina y Brasil son los países con mayor contagio (1.5 y 1.2 millones de personas, respectivamente) seguidos por México (900 mil), Bolivia (600 mil), Colombia (400 mil) y Venezuela (200 mil). En Chile, se reportaron 120 mil personas infectadas, que corresponde al 0.7% de la población [5]. Las áreas endémicas en Chile se extienden entre la región de Arica y Parinacota y la región del Libertador Bernardo O'Higgins [6]. La Tripanosomiasis Americana afecta a alrededor de 6 millones de personas en Latinoamérica y la Organización Mundial de la Salud la categorizó como una de las 13 enfermedades tropicales más desatendidas del mundo [7].

La migración de poblaciones infectadas ha provocado la aparición de la enfermedad en zonas donde no se encuentra el vector, como Estados Unidos, Canadá, algunos países europeos (España, Suiza, Francia, Italia, entre otros), Australia y Japón [8]. En estas zonas no endémicas, la EC es poco conocida, lo que dificulta su correcta prevención, seguimiento y tratamiento.

1.2. Ciclo de vida de *T. cruzi*

El ciclo de vida del parásito tiene etapas de desarrollo tanto en el mamífero infectado como en el vector (**Figura 1**). Cuando las vinchucas se alimentan de un mamífero infectado, estos insectos ingieren tripomastigotes desde su sangre. Una vez en el intestino del vector, los tripomastigotes se transforman en epimastigotes, se replican, y se depositan en las heces en forma de tripomastigote, la forma infectiva. La transmisión a un nuevo mamífero ocurre cuando las heces del vector se ponen en contacto con heridas en la piel del huésped, donde el tripomastigote ingresa a la circulación sanguínea y luego entra a células nucleadas y se convierte en amastigote, que es la forma replicativa intracelular. Finalmente, los amastigotes se

transforman en tripomastigotes y se liberan en el torrente sanguíneo, donde pueden infectar nuevas células [4].

1.3. Manifestaciones clínicas de la EC

La enfermedad de Chagas se presenta en dos fases: aguda y crónica. La fase aguda dura de 4 a 8 semanas y se caracteriza por una alta parasitemia y la aparición de anticuerpos IgM anti-*T. cruzi* desde los 10 días de infección. Sólo en el 10% de los pacientes esta fase presenta síntomas como fiebre, escalofríos, o dolor muscular, aparte de la inflamación en el sitio de inoculación, que genera el denominado signo de Romana o Chagoma. Sin embargo, dada la inespecificidad de estos síntomas, la infección pasa desapercibida y la mayoría de los pacientes evoluciona a la fase crónica [9].

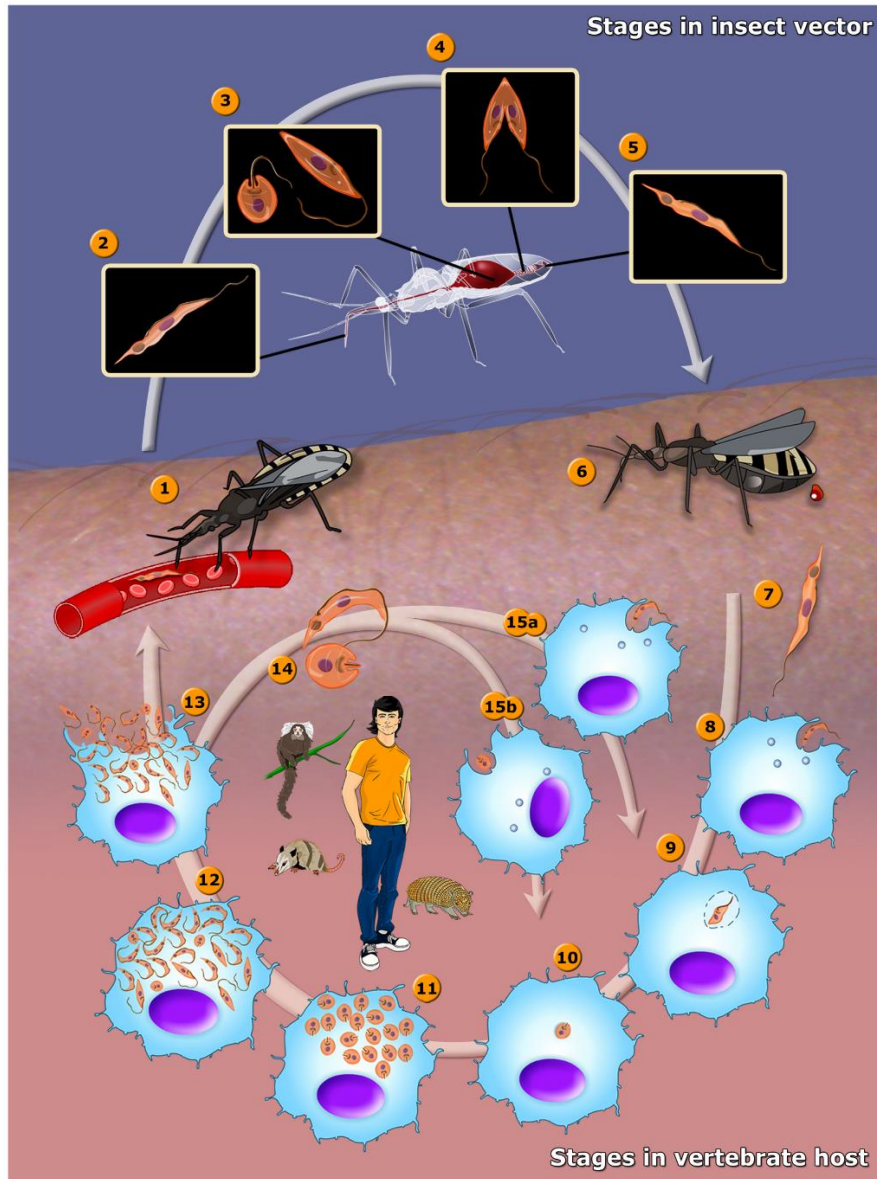


Figura 1. Ciclo de vida de *T. cruzi*. En la imagen se muestran las etapas del desarrollo del parásito en el triatomino vector y en el humano infectado. Imagen obtenida de Teixeira y cols. [10].

La fase crónica comienza a la semana 8, pero se manifiesta luego de 10 a 30 años y se caracteriza por serología positiva y parasitemia negativa [11]. Se manifiesta principalmente como cardiomiopatía, que es la forma más letal, pero también se puede manifestar como enfermedad gastrointestinal (megaesófago, megacolon, disfagia, constipación) y en menor medida enfermedad neurológica (neuritis, demencia o encefalopatía) [12] (**Figura 2**).

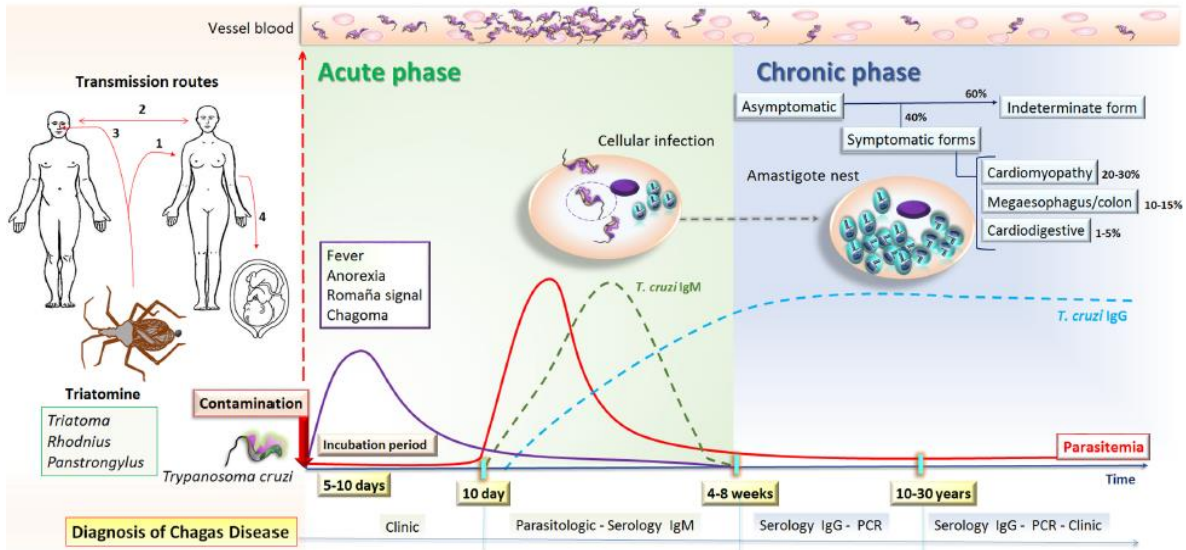


Figura 2. Curso de la infección con *T. cruzi*. La infección con *T. cruzi* puede ser (1) vectorial, (2) por transfusión de sangre o trasplante de órganos, (3) oral, o (4) congénito. El periodo de incubación dura de 5-10 días desde la infección. La fase aguda dura 4-8 semanas y se caracteriza por parasitemia positiva, y anticuerpos IgM anti-*T. cruzi*, además de provocar síntomas inespecíficos. En la fase crónica la parasitemia es negativa y se detectan anticuerpos IgG anti-*T. cruzi*. Luego de 10-30 años de estar crónicamente infectado se presentan manifestaciones cardiacas, digestivas o ambas. Imagen obtenida de Lidani y cols. [13].

T. cruzi pertenece a una especie heterogénea con varias cepas que han sido estudiadas por métodos biológicos, bioquímicos y moleculares. Las cepas de *T. cruzi* se organizan en 7 unidades discretas de tipificación (DTUs), denominadas TcI al TcVI, y Tcbat. Los estudios de tipificación de *T. cruzi* en tejidos de pacientes con cardiomiopatía y/o enfermedad gastrointestinal han determinado que la cepa del parásito es un factor determinante en la forma clínica de la enfermedad [14]. Estudios de genotipificación han demostrado que pacientes infectados con el DTU TcI, al cual pertenece la cepa Dm28, entre muchas otras, tienen una mayor prevalencia de generar alteraciones cardiacas [15].

1.4. Diagnóstico de la EC

En Chile, existe búsqueda activa de EC a toda mujer embarazada, recién nacidos hijos de madre con EC, donantes de sangre, personas inmunosuprimidas y personas con sintomatología compatible [6].

El diagnóstico de la EC depende de la etapa en que se encuentre la enfermedad. La técnica de reacción en cadena de la polimerasa (PCR) es la más sensible en la etapa aguda, e indica presencia de parásitos incluso antes que estos sean visibles al microscopio [16]. Una vez que aumentan los niveles de parásitos, se pueden detectar tripomastigotes sanguíneos mediante microscopía (medición de parasitemia). En la fase aguda más avanzada también es posible analizar niveles séricos de anticuerpos IgM anti *T. cruzi*. Para confirmar la infección crónica es necesario hacer 2 test serológicos con diferentes métodos que detecten diferentes anticuerpos IgG anti *T. cruzi*, y un tercer test si los resultados no son concluyentes [17]. Estos ensayos pueden ser: ensayo por inmunoabsorción ligado a enzimas (ELISA), inmunocromatografía (ICT), ensayo de inhibición de la hemaglutinación (HAI), quimioluminiscencia (CMIA) o inmunofluorescencia indirecta (IIF).

Los criterios de cura terapéutica pueden ser (1) paciente tratado en fase aguda con parasitemia negativa, serología IgG e IgM negativa, y sin síntomas a los 6 meses de terminado el tratamiento, o (2) paciente crónico con parasitemia negativa que presenta serología negativa IgG en al menos un intervalo de 3 meses, y con seguimiento por al menos 10 años [18].

1.5. Tratamiento farmacológico de la EC

Actualmente el tratamiento farmacológico se basa en el uso de fármacos aceptados hace más de 50 años: nifurtimox (NFX) y benznidazol (Bz), los cuales son los únicos fármacos con eficacia probada para la EC. NFX es un derivado de nitrofurano y Bz es un nitroimidazol. Ambos, mediante la acción de nitrorreductasas, forman metabolitos electrofílicos derivados del nitrógeno que se unen a lípidos, proteínas, y ADN del parásito, dañándolo [19]. En Chile, ambos fármacos están disponibles

para el tratamiento de la EC en niños y adultos, aunque debido a la menor prevalencia de efectos adversos, se prefiere la terapia con Bz.

Bz ha demostrado ser efectivo al ser administrado en fase aguda, reduciendo la severidad de los síntomas y la agresividad de la enfermedad con una tasa de cura del 70% [20]. Sin embargo, este fármaco tiene importantes efectos adversos como dermatitis, leucopenia, neuropatía periférica, anorexia, náuseas, vómito o insomnio, lo que conlleva muchas veces a la suspensión del tratamiento [21].

Se ha estudiado nuevos fármacos tripanocidas, principalmente usando triazoles, que actúan como inhibidores de la síntesis de ergosterol del parásito. El estudio clínico CHAGAZOL comparó posaconazol con distintas dosis de Bz en pacientes con qPCR positivo, y se observó que el primero no tiene un efecto sobre la carga parasitaria mejor que Bz [22]. Además, el estudio STOP-CHAGAS administró posaconazol con Bz en monoterapia, y en combinación, y Bz en monoterapia mostró mejor cura parasitológica que posaconazol y que la combinación de ambos [23]. Por lo tanto, aun es necesario encontrar fármacos tripanocidas efectivos, mejor tolerados y de bajo costo.

2. Cardiopatía Chagásica Crónica (CCC)

Aunque las enfermedades gastrointestinales chagásicas se presentan en el 5-10% de los pacientes, la CCC es la forma más seria y común de la enfermedad [24]. La CCC es responsable de la incapacidad de trabajar, baja calidad de vida y mortalidad de los pacientes crónicos [25]. En Chile, el 73% de las defunciones por EC se debe a la CCC [6]. Estos signos y síntomas clínicos producen un alto costo en el sistema sanitario, económico, social y familiar, lo que genera un problema de salud pública de gran envergadura. La CCC tiene peor pronóstico que otras cardiopatías como la enfermedad cardíaca hipertensiva [26], la cardiopatía dilatada [27] y la cardiopatía isquémica [28].

2.1. Manifestaciones clínicas de la CCC

La CCC tiene cuatro manifestaciones básicas: anomalías en la conducción eléctrica, disfunción en la contractilidad del miocardio, aneurismas y tromboembolismo. Los cambios en el ritmo cardiaco determinados por electrocardiograma (ECG) son predictores de la severidad de la enfermedad. Las anomalías en el ECG pueden ir desde una bradicardia sinusal, bloqueo de la rama derecha, hasta arritmias severas y muerte súbita [29]. Las anomalías en la contracción de las paredes cardiacas provocan una disminución en la función ventricular. Las principales manifestaciones ecocardiográficas son las anomalías en el movimiento de las paredes (hipoquinesia, aquinesia o disquinesia), insuficiencia de la válvula mitral y tricúspide, disfunción sistólica biventricular, cardiomiopatía dilatada, aneurismas y trombos [30, 31]. Los aneurismas son principalmente localizados en la zona apical del ventrículo izquierdo (82% de los casos) y se observan en el 55% de los pacientes con CCC [32]. Estos aneurismas junto con las arritmias y la disfunción sistólica ventricular son las mayores causas de la formación de trombos y accidentes cerebrovasculares en la CCC [33]. La principal causa de muerte en pacientes con CCC es la muerte súbita (55-65%), seguida por insuficiencia cardiaca (25-30%) y embolismo cerebral o pulmonar (10-15%) [11].

A nivel histopatológico, la CCC se caracteriza por una mínima parasitemia y parasitismo cardiaco, un amplio infiltrado inflamatorio, edema intersticial y una intensa fibrosis [34, 35]. A través de estudios histológicos de autopsias de pacientes con CCC, se ha determinado que el tejido cardiaco de estos pacientes tiene hasta un 50% de fibrosis, y una importante infiltración inflamatoria compuesta de un 50% de macrófagos, 40% de linfocitos T y 10 % de linfocitos B [36].

2.2. Tratamiento de la CCC

El tratamiento de la CCC se ha basado principalmente en la evidencia de otras cardiomiopatías o de estudios que incluyeron un pequeño grupo de pacientes con CCC, por lo que hay pocas terapias con recomendaciones sólidas para esta enfermedad. Los fármacos utilizados para la CCC son principalmente β -bloqueadores, inhibidores de la enzima convertidora de angiotensina (iECA), bloqueadores del receptor de angiotensina, antagonistas de receptor de mineralocorticoides, digoxina, diuréticos y anticoagulantes [37]. Las manifestaciones cardíacas de la enfermedad de Chagas también pueden necesitar procedimientos quirúrgicos invasivos como marcapasos, desfibrilador cardioversor implantable o trasplante de corazón. El trasplante de corazón solo está contraindicado para pacientes con megaesófago o megacolon. En el caso de reactivación de *T. cruzi* por tratamiento con inmunosupresores, el tratamiento recomendado es Bz [38].

El año 2015 fue publicado el estudio “Evaluación de Benznidazol para interrumpir la Tripanosomiasis” (BENEFIT), en el que se evaluó la eficacia y seguridad del Bz para reducir características clínicas en pacientes con CCC [39]. A pesar de disminuir la carga parasitaria, Bz no redujo significativamente la tasa de pacientes con una o más de estas manifestaciones: muerte, paro cardiorrespiratorio, inserción de marcapasos o desfibrilador automático implantable, taquicardia ventricular sostenida, trasplante cardiaco, insuficiencia cardiaca, accidente cerebrovascular, isquemia o un evento tromboembólico pulmonar. Por lo tanto, es necesario encontrar nuevas estrategias farmacológicas que acompañen el efecto sobre la carga parasitaria de los fármacos tripanocidas en los pacientes con CCC.

2.3. Patogénesis de la CCC

Debido a la complejidad de la CCC, su patogénesis no está completamente dilucidada. Existen dos principales mecanismos que explican la patogenia de la

CCC: daño dependiente de la persistencia del parásito y daño mediado por la respuesta inmune [40].

A pesar de que no se puede observar el parásito mediante técnicas histológicas, los métodos de PCR e inmunoensayos son capaces de identificar material genético y antígenos de *T. cruzi* en pacientes con CCC [41, 42]. Además, se ha observado en modelos animales que la carga parasitaria tisular se relaciona con la intensidad de la inflamación, y que los fármacos tripanocidas, al reducir la carga parasitaria, atenúan la miocarditis [43, 44]. Todo esto demuestra que existe un daño provocado por la persistencia del parásito en el organismo. Por otro lado, la exacerbación del ambiente proinflamatorio puede producir daño a nivel tisular inducido por citoquinas proinflamatorias, por lo que el estudio de la inmunidad en la CCC es indispensable en la búsqueda de nuevas terapias.

3. Inmunidad en la CCC

Durante la fase aguda de la infección se desencadena una respuesta inmune innata que logra controlar al parásito, pero no eliminarlo (**Figura 3**). Los monocitos activados a macrófagos y las células dendríticas promueven la endocitosis del parásito, con la consiguiente expresión de citoquinas como IL-12 e IFN- γ , produciendo linfocitos T y B específicos contra *T. cruzi*, que migran hacia el sitio de daño en respuesta de quimioquinas [45]. Este infiltrado de células mononucleares está asociado a la muerte local de cardiomiocitos y fibrosis. La persistencia del parásito hace que esta activación del sistema inmune se mantenga por años, produciendo una inflamación crónica que conlleva al desarrollo de CCC [11].

El mecanismo por el cual la respuesta inmune provoca CCC aún no está completamente esclarecido, sin embargo, existen antecedentes que relacionan el tipo de citoquinas sintetizadas con las manifestaciones clínicas en los pacientes [46]. La mayoría de los pacientes que entran a la fase crónica permanecen en la forma indeterminada, que es asintomática y presenta un perfecto equilibrio entre el

parásito y el hospedero [47]. Esta fase indeterminada se ha asociado con una predominante producción de citoquinas antiinflamatorias como IL-10 e IL-17 [48]. Estos resultados son consistentes con los altos niveles de citoquinas proinflamatorias como TNF- α e IFN- γ encontradas en pacientes con CCC [49], donde existe un ambiente proinflamatorio que podría ser el responsable de la miocarditis crónica. Por lo tanto, es posible que la producción de citoquinas antiinflamatorias en estadios tardíos de infección sea necesario para mantener el parásito bajo control y evitar el daño tisular característico de la CCC.

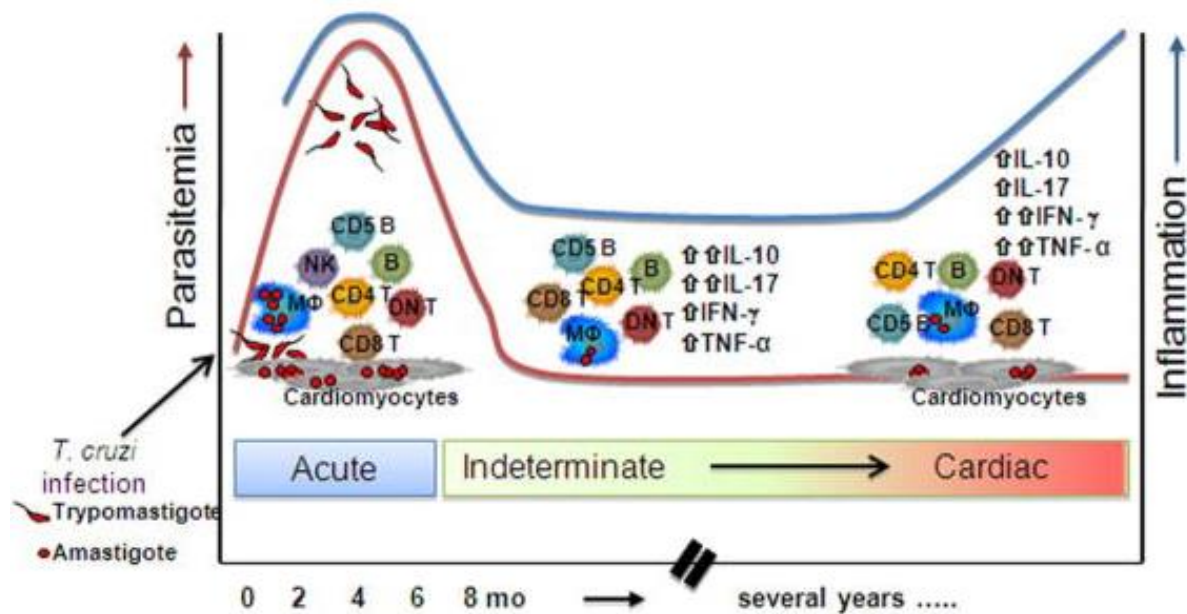


Figura 3. Progresión de la inmunidad en la EC. Luego de la infección, los pacientes con EC desarrollan parasitemia, acompañada por una activación del sistema inmune que intenta eliminar al parásito, pero no lo logra, por lo que avanza a la fase crónica. La mayoría de los pacientes crónicos presentan la forma indeterminada (asintomática), asociada con un bajo índice inflamatorio. Aproximadamente el 30% de los pacientes crónicos progresan a la forma cardíaca, asociada con un mayor estado proinflamatorio. Imagen extraída de Machado y cols. [4].

3.1. Macrófagos

Las células fagocíticas mononucleares se generan a partir de células madre hematopoyéticas ubicadas en la médula ósea. Los precursores de macrófagos son

liberados a la sangre como monocitos, y se depositan principalmente en el bazo donde se almacenan [50]. Cuando hay algún signo de daño o patógeno, los monocitos migran por la circulación y se extravasan a través del endotelio, donde se diferencian a macrófagos.

Se conocen 2 fenotipos de macrófagos: M1 y M2 [51] (**Figura 4**). Los monocitos clásicamente activados se diferencian a macrófagos M1 luego de la estimulación con moléculas de origen bacteriano como lipopolisacáricos (LPS) y citoquinas proinflamatorias como IFN- γ . Los macrófagos M1 se caracterizan por producir citoquinas proinflamatorias como TNF- α , IL-1 β , IL-6, e IFN- γ ; además presentan una capacidad fagocítica alta y producen especies reactivas de oxígeno (ROS) [52]. Los macrófagos M1 tienen funciones inflamatorias, y su rol principal es el control de patógenos intracelulares [53]. Este tipo de macrófagos está asociado a daño tisular cuando no es bien regulado.

Los monocitos alternativamente activados se diferencian a macrófagos M2 con estímulos como TGF- β o citoquinas antiinflamatorias como IL-4, IL-10 e IL-13 [54]. Estos macrófagos tienen funciones antiinflamatorias/inmunorreguladoras y están relacionados con la reparación tisular [55]. El fenotipo M2 además se subdivide en 4 subtipos, M2a, M2b, M2c y M2d [56]. Los macrófagos M2a están relacionados con las reacciones alérgicas, fibrogénesis, reparación tisular y proliferación celular [57]. Los M2b actúan como inmunorreguladores, reclutando linfocitos TH2 y linfocitos T reguladores (Tregs) [58]. El fenotipo M2c está involucrado en la regeneración tisular y angiogénesis [54]. Los macrófagos M2d tienen como función la inhibición de la respuesta inmune y la promoción de la angiogénesis [57].

A pesar de que esta clasificación parezca rígida, se ha demostrado que hay una alta plasticidad en el fenotipo de los macrófagos, por lo que pueden repolarizar bajo ciertas condiciones, pasando de un fenotipo M1 a M2 y viceversa [59, 60].

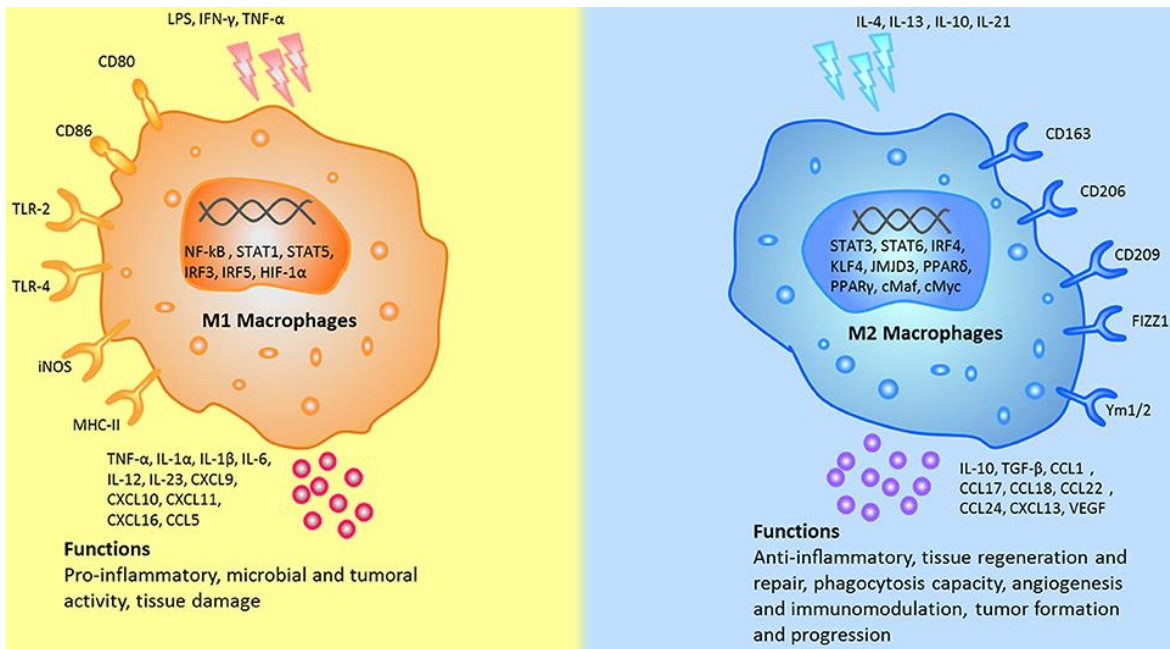


Figura 4. Polarización de macrófagos. Diferentes estímulos, marcadores de superficie, citoquinas secretadas y funciones de los macrófagos M1 y M2. Imagen extraída de Yao Y, y cols. [61].

3.2. Polarización de macrófagos en la CCC

Durante la fase aguda de la infección con *T. cruzi*, los macrófagos inducen la producción de una cascada de citoquinas proinflamatorias y de óxido nítrico (NO) que contribuyen al control del parásito. Esta respuesta inflamatoria inicial conlleva a una polarización tipo M1 [62]. A su vez, macrófagos y células NK sintetizan citoquinas reguladoras para disminuir el daño producido por una excesiva estimulación proinflamatoria [45], produciendo una polarización M2, lo que permite la persistencia del parásito. Por lo tanto, en la etapa aguda hay un equilibrio entre los dos fenotipos, el que se pierde al progresar a la fase crónica.

Se ha observado que tanto los macrófagos presentes en corazones con CCC, como los expuestos *in vitro* a *T. cruzi* están polarizados hacia el fenotipo M1 y que los macrófagos de los pacientes indeterminados (asintomáticos) producen más IL-10, [63, 64]. El año 2016, el grupo de Wan y cols. observó una correlación directa entre el aumento de la población M2, la disminución de citoquinas proinflamatorias y la

disminución de la disfunción ventricular en ratones con Chagas crónico (día 45-66 post-infección) [65]. Además, se ha observado que el uso de una vacuna de ADN y proteínas (TcVac2) en ratones infectados con *T. cruzi* disminuye la inflamación y fibrosis en fase crónica [66], y que el suero de estos ratones inmunizados promueve una polarización M2 en macrófagos *in vitro*. Por lo tanto, la modificación farmacológica de la polarización de macrófagos M1 hacia M2 podría prevenir el daño tisular provocado en los pacientes con CCC.

3.3. Disfunción endotelial en la CCC

Uno de los mecanismos fisiopatológicos involucrados en la CCC es la presencia de anomalías microvasculares e isquemia, inducido por una activación y disfunción endotelial [67]. Las células endoteliales (CEs) son uno de los primeros blancos de los parásitos. Estudios *in vitro* e *in vivo* indican que la infección del endotelio resulta en la expresión de citoquinas proinflamatorias y moléculas de adhesión endotelial (CAMs), los que son componentes importantes en la respuesta inflamatoria contra el parásito [68].

La acumulación de leucocitos en la vasculatura depende de su interacción con las células endoteliales, mediante CAMs. Las selectinas median el rodamiento de los leucocitos, mientras que la adhesión y transmigración están mediadas por VCAM-1, ICAM-1 y PECAM-1 [69]. Los pacientes con CCC tienen niveles altos de la forma soluble de VCAM-1 (sVCAM-1) y de P-selectina (sP-selectina), e incluso hay una asociación positiva entre la severidad de la enfermedad y los niveles séricos de P-selectina [70]. A pesar de que se ha estudiado el efecto directo del parásito sobre la activación endotelial, no se conoce el efecto de las citoquinas producidas por macrófagos en respuesta a la infección con *T. cruzi* sobre la activación de las células endoteliales.

4. Vía Rho/Rho Kinasa (ROCK)

Las GTPasas Rho (**Ras homologous**) son una familia de proteínas G pequeñas (21 kDA aprox.) que regulan principalmente la dinámica de actina [71]. RhoA es el miembro más estudiado de la familia, y, aparte de su rol en la organización de actina, regula muchas funciones celulares como contracción, motilidad, proliferación y apoptosis [72]. RhoA cambia de un estado inactivo (unida a GDP) a uno activo (unida a GTP) para interactuar con sus efectores. Rho Kinasa (ROCK) es una serina/treonina quinasa, y es el principal y más estudiado efector de RhoA [73]. Existen dos isoformas de ROCK, codificados en 2 genes distintos: ROCK-1 y ROCK-2. Ambas quinasas contienen un dominio serin-treonin quinasa en su porción amino terminal, seguido por una región de hélice superenrollada (CCR) que contiene un dominio de unión a Rho (RBD), y en su extremo carboxilo terminal contienen un dominio homólogo a Pleckstrina (PH) con una porción rica en cisteína (CRD) (**Figura 5A**). Ambas isoformas son altamente homologas, con una identidad de secuencia de aminoácidos de un 92% en el dominio quinasa y ambas están ubicuamente expresada en los tejidos [74]. El dominio carboxilo terminal forma un loop autoinhibitorio que se pliega sobre el dominio quinasa, inhibiendo la actividad de ROCK. RhoA unido a GTP se une al dominio RBD y libera el dominio catalítico de ROCK, manteniéndolo accesible a sus sustratos, lo que resulta en la activación de ROCK (**Figura 5B**). Existen otras enzimas que activan a ROCK mediante un clivaje entre el dominio CCR y el dominio PH, como caspasa-3, que activa a ROCK-1, y caspasa-2 y granzima B, que activan a ROCK-2 [75].

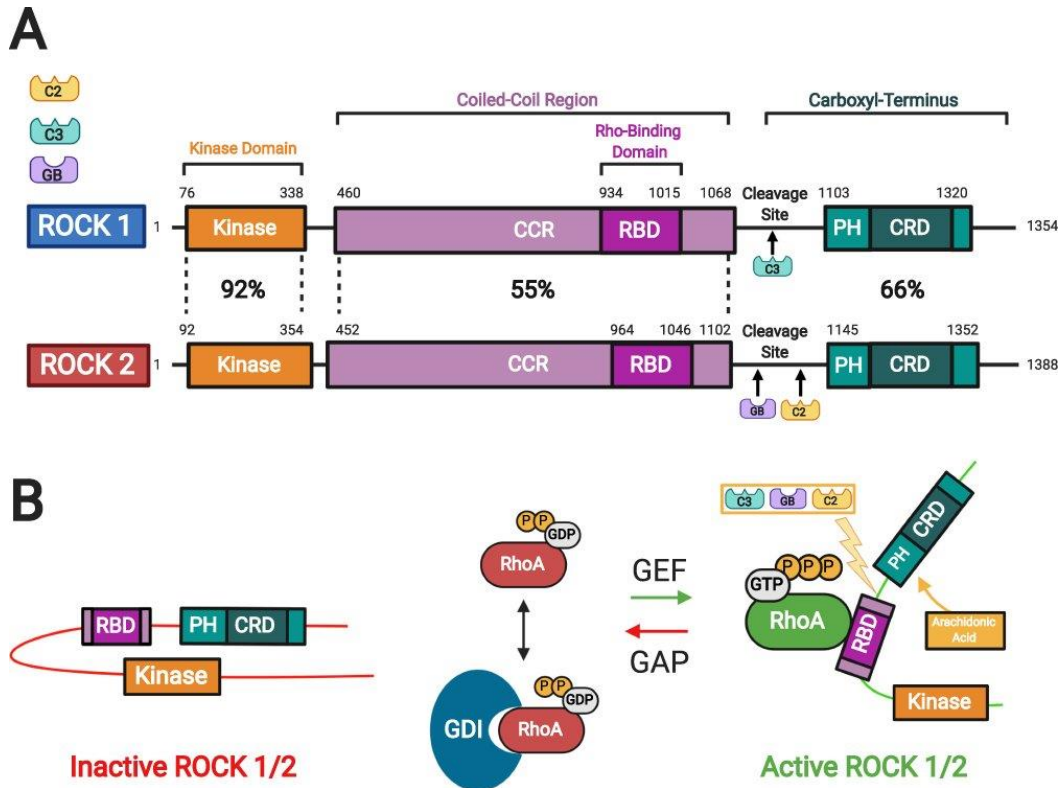


Figura 5. Estructura y mecanismos de activación de ROCK-1 y ROCK-2. (A) Dominios de ROCK-1 y ROCK-2. Ambas isoformas contienen un dominio kinasa en su porción N-terminal, un dominio de unión a Rho (RBD), y un dominio PH en su porción C-terminal. (B) En la forma inactiva de ROCK, su dominio PH y RBD se unen al dominio kinasa, formando un loop autoinhibitorio. RhoA-GTP se une al RBD, induciendo una conformación abierta, liberando la capacidad catalítica del dominio kinasa. ROCK-1 además puede ser activado al ser clivado por caspasa-3 (C3), y ROCK-2 por caspasa-2 (C2) y granzima B (GB). Imagen extraída de [75].

ROCK-1 y ROCK-2 comparten más de 20 sustratos, dentro de los que se encuentran la fosfatasa de la cadena liviana de la miosina (MYPT1), a la que fosforila para impedir la inactivación de la cadena liviana de la miosina (MLC), y así promover la contracción muscular [76]. Además, ambas pueden directamente fosforilar a MLC, activándola. Otros blancos son NHE-1, involucrado en la migración celular, LIM kinasa (LIMK), el cual fosforila a cofilina, estabilizando filamentos de actina [77], y la familia extrínica, radixina y moesina (ERM), involucrada en la interacción entre filamentos de actina y la membrana plasmática. En conjunto, estos

blancos controlan procesos celulares como adhesión, migración, proliferación, contracción, fagocitosis y apoptosis [78] (**Figura 6**).

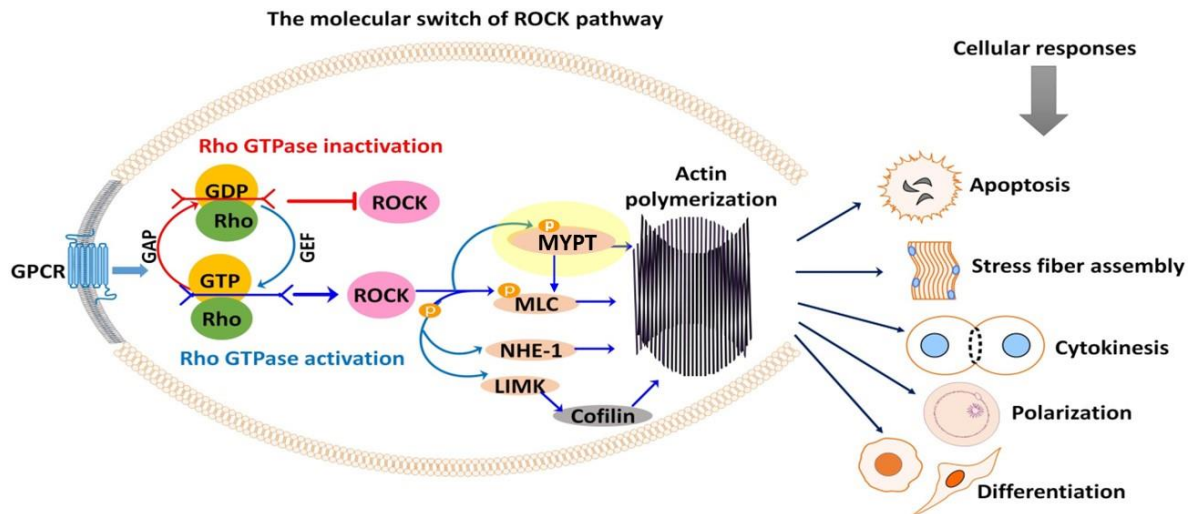


Figura 6. Vía Rho/ROCK. La activación de ROCK y subsecuente fosforilación de sus sustratos río abajo son responsable de eventos celulares como apoptosis, formación de fibras de estrés, citocinesis, polarización, adhesión y diferenciación celular. Imagen extraída de [79].

4.1. Rol de ROCK en la polarización de macrófagos

La migración e infiltración de monocitos requiere de los filamentos de actina. Usando un inhibidor de ROCK-1/2 (Y-27632) se demostró que ROCK es necesario en el proceso de migración trans-endotelial de monocitos [80]. ROCK ha demostrado tener un rol en la polarización de macrófagos hacia el fenotipo proinflamatorio M1 [81]. Además, el uso de Fasudil, un inhibidor de ROCK-1/2, produjo un cambio en la polarización de macrófagos de M1 a M2 en un modelo murino de encefalomiелitis autoinmune [82]. Por lo tanto, la inhibición de ROCK podría ser un mecanismo farmacológico para cambiar la polarización de macrófagos M1 inducidos por *T cruzi* hacia M2, y así disminuir el daño tisular producido en la CCC. Sin embargo, no hay fármacos inhibidores de ROCK aprobados por la FDA que puedan ser actualmente usados en la práctica clínica.

4.2. Rol de ROCK en la infección con *T. cruzi*

La unión de glicoproteínas de la superficie del parásito a los receptores tipo Toll (TLR) TLR2 y TLR4, inicia el proceso de infección activación de los macrófagos [83]. Esta interacción gatilla una cascada de señalización intracelular, que involucra la activación del factor nuclear kappa B (NF- κ B) que induce la síntesis de citoquinas proinflamatorias como TNF- α e IL-6, presentando un fenotipo de macrófagos M1 [83, 84]. Sin embargo, no se ha estudiado el efecto de la infección con *T. cruzi* sobre la vía RhoA/ROCK.

Se ha descrito que LPS activa a NF- κ B vía TLR4 induciendo un fenotipo tipo M1 en macrófagos, y que la activación de NF- κ B es mediada por ROCK [85-88]. Además, en 2015 Wang y cols. descubrieron que la inhibición de ROCK por Y27632 disminuye la producción de TNF- α e IL-1 β inducida por LPS en ratones [89]. Por lo tanto, es probable que *T. cruzi* active la vía Rho/ROCK en macrófagos vía TLR2 y/o TLR4, y que esto induzca su polarización hacia M1 mediante la activación de NF- κ B.

A pesar de que no se ha estudiado el rol de ROCK en la EC *in vitro* ni *in vivo*, existe evidencia del papel de su papel en procesos como hipertrofia, fibrosis cardiaca, y apoptosis de cardiomiocitos [90, 91]. De hecho, inhibidores de ROCK como fasudil y sus derivados han sido estudiados para el uso clínico de hipertensión pulmonar [92], y han demostrado efectos beneficiosos en otras enfermedades cardiovasculares como hipertensión, accidente cerebrovascular e infarto cardiaco [93]. Es por esto por lo que la modulación de ROCK no solo podría ser una estrategia para la regulación de la respuesta inmune, sino que también para la prevención de la insuficiencia cardiaca en la CCC.

5. Estatinas

Las estatinas son fármacos hipolipemiantes, ya que inhiben la enzima 3-hidroxi-3-metil-glutaril-Coenzima A (HMG-CoA) reductasa, enzima limitante de la vía del

mevalonato, que es responsable de la síntesis de colesterol. Además, el mevalonato es esencial para la síntesis de intermediarios isoprenoides como el pirofosfato de farnesilo y el pirofosfato de geranilo [94]. Estos isoprenoides son importantes para la traslocación a la membrana y activación de GTPasas pequeñas, como RhoA (**Figura 7**) [95]. Es por esto por lo que en este proyecto se propone utilizar una estatina para inhibir a RhoA/ROCK.

Estudios *in vitro* e *in vivo* han demostrado que la simvastatina puede atenuar la expresión de moléculas de adhesión inducida por *T. cruzi*, mediante la inhibición de NF- κ B, disminuyendo el infiltrado inflamatorio y la fibrosis [96, 97]. Además, se demostró que simvastatina cambia el fenotipo de M1 a M2 en macrófagos inducidos por LPS [98]. Por otro lado, se observó que atorvastatina disminuye la activación de ROCK en leucocitos y la aparición de la proteína C reactiva en pacientes con aterosclerosis [99], y que el tratamiento con atorvastatina aumenta la población de macrófagos M2 y las citoquinas antiinflamatorias tanto en pacientes con aterosclerosis como en macrófagos en cultivo [100].

La atorvastatina es una estatina ampliamente usada en Chile, por su bajo costo y alta eficacia [101]. Es un fármaco sintético y lipofílico, lo que presenta un beneficio al trabajar *in vitro* ya que atraviesa fácilmente la membrana plasmática para ejercer su efecto [102]. Además, no es un profármaco, por lo que es activa sin necesidad de ser metabolizada. Asimismo, es un fármaco bien tolerado por los pacientes, con un amplio rango de dosis y baja prevalencia de efectos adversos.

Debido a estos antecedentes, y a los estudios anteriormente mencionado, en los estudios *in vitro* de este proyecto se utilizará atorvastatina, que es un fármaco aprobado por tanto por la FDA como por el Instituto de Salud Pública de Chile, y que podría estar disponible para el manejo coadyuvante de enfermedades desatendidas como el Chagas.

A pesar de todos los estudios relacionados con los efectos pleiotrópicos de las estatinas, existe muy poca bibliografía que relacione estos fármacos con la polarización de macrófagos, pues están principalmente enfocados en aterosclerosis. Por lo tanto, medir el efecto de la inhibición de ROCK mediada por atorvastatina sobre la polarización de macrófagos activados por *T. cruzi* es una propuesta nueva que podría incluir la inhibición de ROCK como un mecanismo farmacológico para disminuir la disfunción cardíaca presente en la CCC.

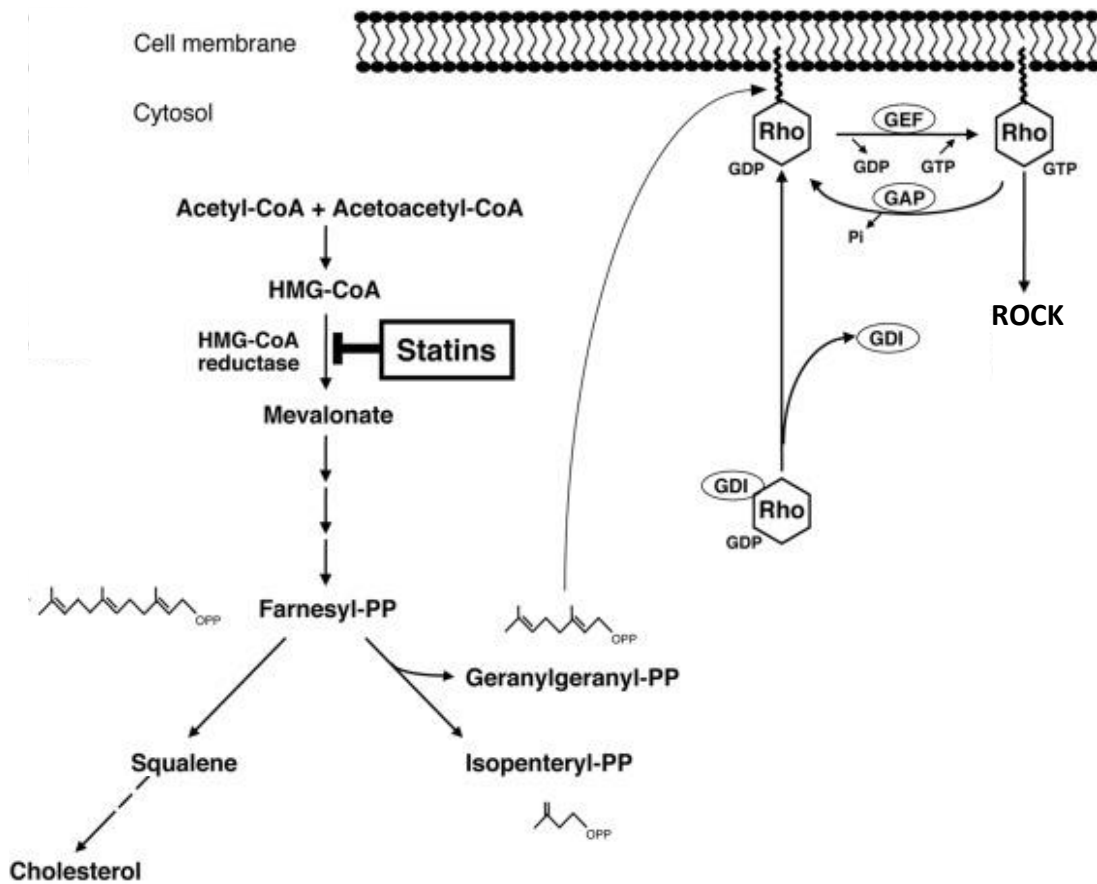


Figura 7. Inhibición de Rho/ROCK por estatinas. La inhibición de HGM-CoA reductasa provoca una disminución de la síntesis de pirofosfato de geranilo, que se une a las proteínas G pequeñas como Rho para provocar su traslocación a la membrana, donde puede ejercer sus efectos. La activación de Rho es mediante GEFs, que son factores que inducen el cambio de GDP por GTP, y su inactivación es mediante GAPs, factores que activan la hidrólisis de GTP a GDP. Además, los GDI secuestran a Rho impidiendo su activación. A pesar de toda esta regulación, Rho sólo puede ser activada cuando se encuentra traslocada

a la membrana mediante geranilación. Es de este modo que las estatinas impiden la activación de Rho y de su efector ROCK. Extraído de Takemoto y cols. [95].

HIPÓTESIS

La inhibición de ROCK por atorvastatina promueve una polarización tipo M2 en macrófagos infectados con *T. cruzi*, lo que reduce la activación de células endoteliales.

OBJETIVO GENERAL

Determinar el efecto de atorvastatina sobre la actividad de ROCK, y su rol en la polarización de macrófagos humanos infectados con *T. cruzi*.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS

1. Evaluar la activación de ROCK por tripomastigotes de *T. cruzi* en macrófagos humanos.
2. Identificar el rol de ROCK sobre la polarización de macrófagos humanos infectados con *T. cruzi*.
3. Determinar la capacidad de atorvastatina de inhibir la activación de ROCK inducida por *T. cruzi*.
4. Evaluar el efecto de atorvastatina sobre la polarización de macrófagos humanos infectados por *T. cruzi*.
5. Identificar el rol de ROCK-1 y ROCK-2 en el efecto de atorvastatina sobre la polarización de macrófagos humanos infectados por *T. cruzi*.
 1. Sintetizar líneas celulares U937 con expresión estable de ROCK-1 y ROCK2 constitutivamente activas.
 2. Evaluar el efecto de atorvastatina sobre las células ROCK-1 y ROCK-2 constitutivamente activas.
6. Determinar el efecto de la polarización de macrófagos sobre la activación de células endoteliales vasculares cardiacas.
7. Evaluar el efecto del tratamiento con simvastatina sobre la expresión de ROCK-1, ROCK-2 y citoquinas en tejido cardíaco de ratones con CCC.

MATERIALES Y MÉTODOS

1. Cultivo celular

Las células U937 de leucemia promielocítica humana fueron cultivadas en medio RPMI con 10% SFB. Para los experimentos, las células se diferenciaron a macrófagos por la incubación con PMA 10 ng/mL por 48 horas (**Figura 8**). Las células Vero fueron cultivadas en medio RPMI 5% SBF y usadas para amplificar los tripomastigotes de la cepa Dm28 de *T. cruzi*. Las células HEK293T fueron cultivadas en DMEM 10% SBF y usadas para la producción de lentivirus. Las células HMVEC-C (Lonza) fueron cultivadas en medio EGMTM-2MV (Lonza). Todos los cultivos celulares fueron mantenidos a 37°C, 5% CO₂, y suplementados con penicilina (100 U/mL) y estreptomycin (100 µg/mL).

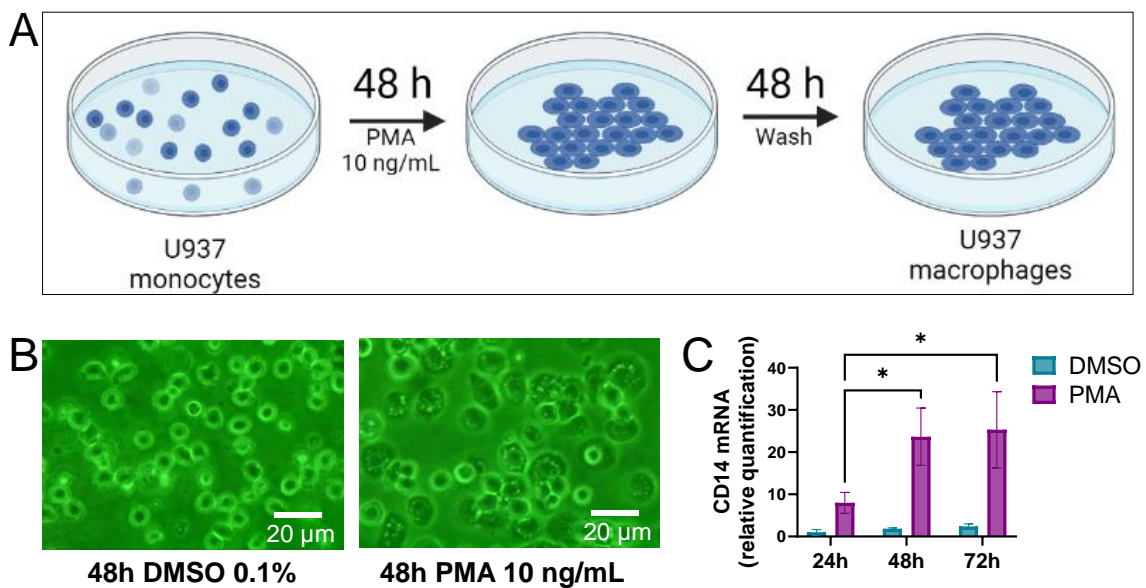


Figura 8. Diferenciación de monocitos U937 a macrófagos con PMA. (A) El cultivo de monocitos U937 fue incubado con 19 ng/mL por 48 h, luego se lavó el medio y se dejó con medio fresco por otras 48 h. **(B)** Fotografías del cultivo con y sin PMA. **(C)** Cuantificación de niveles de ARNm de CD14, marcador de diferenciación a macrófagos.

2. Infección con *Trypanosoma cruzi*

Para amplificar los parásitos, las células Vero fueron infectadas con tripomastigotes al MOI 5:1. Luego de 5 días los parásitos fueron extraídos desde el medio de cultivo, centrifugados a 3.500 rpm, y contados para infectar las células U937 usando un multiplicador de infección (Multiplicity of Infection, MOI) 1:1 según corresponda el experimento.

3. Tratamientos

Las células fueron tratadas con atorvastatina 0.1, 1 y 10 μ M (Sigma-Aldrich) por 24 horas, el inhibidor de ROCK, Y-27632, 10 μ M (cell signaling) por 1 hora, el inhibidor de TLR4, TAK-242, 10 μ M (cell signaling) o el inhibidor de la localización nuclear de P65, JSH-23, (30 μ M) (Sigma-Aldrich) durante 1 hora antes de la incubación con *T. cruzi* en cada experimento.

4. Adhesión de células endoteliales

Los medios condicionados de macrófagos tratados con atorvastatina e infectados con *T. cruzi* fueron incubados con células HMVEC-C por 6 horas para la evaluación de moléculas de adhesión por RT-qPCR, o por 24 horas para evaluar la adhesión a monocitos. Luego de las 24 horas, el medio condicionado fue lavado y las células endoteliales fueron co-cultivadas con monocitos U937-GFP por 2 horas. Luego de las 2 horas de co-cultivo, se lavó 3 veces con PBS, se evaluó la adhesión mediante microscopía epifluorescente, y mediante fluorimetría en un equipo varioscan.

5. Modelo animal

El modelo animal de CCC fue publicado previamente [103], y autorizado por el Comité de Bioética de la Facultad de Medicina de la Universidad de Chile (protocolo CBA a0937 FMUCH). En resumen, se infectaron ratones BALB/c con 10^3 tripomastigotes Dm28 de *T. cruzi* por vía intraperitoneal. Luego de 60 días post-infección (fase crónica), los ratones fueron tratados con simvastatina 1 mg/Kg al día

o vehículo (0,5% carboximetilcelulosa; CMC) al día, por 20 días. Al día 80 post-infección, los ratones fueron sujetos a eutanasia con ketamina 100 mg/Kg y xilazina 10 mg/Kg para la extracción de los corazones de los animales. Los análisis en tejido cardiaco fueron realizados mediante RT-qPCR.

6. Inmunohistoquímica de tejido cardiaco

Luego de la eutanasia, los corazones de los animales fueron extraídos y fijados en formaldehído al 4% (pH 7.3) por 12 h, deshidratados en alcohol, clarificados en xileno, y embebidos en parafina para ser seccionados con un grosor de 5 μ m. Los niveles de p-MYPT1 fueron evaluados usando la técnica de inmunoperoxidasa, mediante el anticuerpo primario anti-p-MYPT1 (T696) (Cell Signaling, USA #5163). La tinción fue realizada mediante el kit de peroxidasa y diaminobencidina (DAB) (Vector Laboratories, USA). Los tejidos fueron también teñidos con hematoxilina. Las imágenes fueron obtenidas mediante el microscopio de epifluorescencia Nikon Eclipse 400 (Nikon, Japan) y analizadas mediante el software ImageJ.

7. Western Blot

Los extractos proteicos fueron cuantificados mediante el método de Bradford y sometidos a electroforesis en gel de acrilamida/bisacrilamida (A/BA) al 10%. La electroforesis se realizó a 100 Volts y la transferencia sobre membranas de nitrocelulosa a 350 mA por 90 minutos. Las membranas fueron bloqueadas con leche libre de grasa al 5% en TBS-Tween (0,1%) e incubadas con los correspondientes anticuerpos primarios durante toda la noche a 4°C, y anticuerpos secundarios conjugados con HRP (peroxidasa de rabanita) durante 2 horas a temperatura ambiente. Los anticuerpos usados están especificados en la **Tabla 1**. Para la detección de la actividad enzimática peroxidasa se utilizó el método quimio luminiscente de ECL.

Tabla 1. Anticuerpos primarios y secundarios utilizados en Western Blot.

Anticuerpo	Isotipo	Marca y Catálogo	Dilución
Anti-ROCK-1	Rabbit	Cell Signaling #4035	1:1000
Anti-ROCK-1	Rabbit	Abcam #156284	1:1000
Anti-ROCK-2	Rabbit	Cell Signaling #9029	1:1000
Anti-MYPT	Rabbit	Cell Signaling #2643	1:1000
Anti-pMTP	Rabbit	Cell Signaling #5163	1:1000
Anti-P65	Rabbit	Cell Signaling #8242	1:1000
Anti-pP65	Rabbit	Cell Signaling #3033	1:1000
Anti-GAPDH	Rabbit	Cell Signaling #2118	1:5000
Anti- α -tubulina	Mouse	Sigma #4500087	1:5000
Anti- β -Actina	Mouse	Cell Signaling #8457	1:20000
Anti-GFP	Mouse	Santa Cruz #8334	1:1000
Anti-HA	Rabbit	Santa Cruz #805	1:1000
Anti-Mouse		Santa Cruz #516102	1:5000
Anti-Rabbit		Santa Cruz #2357	1:5000

8. RT-qPCR

Las células U937 y el tejido cardíaco fueron lisados con TRIzol® (Invitrogen®, USA) según las indicaciones del fabricante. La transcripción inversa se realizó con transcriptasa reversa M-MLV (Invitrogen®) según las instrucciones del fabricante. Las reacciones de qPCR se llevaron a cabo con SYBR® Green PCR Master Mix (Bioline®) usando los partidores especificados en la **Tabla 2**. La expresión génica relativa se analizó utilizando el método $2^{-\Delta\Delta Ct}$, usando GAPDH como gen constitutivo.

Tabla 2. Partidores utilizados para qPCR

Gen	Especie	Partidor Forward (5'→3')	Partidor Reverse (5'→3')
IFN- γ	Humano	CTGTTACTGCCAGGACCCAT	TTTCTGTCACTCTCCTCTTTCCA
TNF- α	Humano	TCCCCAGGGACCTCTCTCTA	GAGGGTTTGCTACAACATGGG
IL-6	Humano	CTCAATATTAGAGTCTCAACCCCA	GAGAAGGCAACTGGACCGAA
IL-1 β	Humano	TTCGAGGCACAAGGCACAA	TGGCTGCTTCAGACACTTGAG

IL-10	Humano	CGAGATGCCTTCAGCAGAGT	GGCAACCCAGGTAACCCTTA
IL-4	Humano	CATCTTTGCTGCCTCCAAGAACA	GTTCTGTGCGAGCCGTTTCA
TGF- β	Humano	CCGTGGAGGGGAAATTGAGG	TGAACCCGTTGATGTCCACTT
Arg-1	Humano	ACTTAAAGAACAAGAGTGTGATGTG	CACCAGGCTGATTCTTCCGT
ROCK1	Humano	TGAAAGCCGCACTGATGGAT	GCCATGAGAAAACACATTGCAG
ROCK2	Humano	TGGGATAACATAAGAGAAACGGC	TGTCATCGAAATTGCTGCTGT
ICAM1	Humano	TTCCTCACCGTGTACTGGACT	GGGTAAGGTTCTTGCCCACT
VCAM1	Humano	GGACCACATCTACGCTGACA	TTGACTGTGATCGGCTTCCC
PECAM1	Humano	GGTCAAAGGATCAGACGACCT	GGTGGTGGCAAGGGACTAAG
MCP1	Humano	TCCCAAAGAAGCTGTGATCTTCA	TTTGCTTGTCCAGGTGGTCC
GAPDH	Humano	AAAGCCTGCCGGTGACTAAC	CCCAATACGACCAAATCAGAGAATA
ROCK1	Ratón	CTTTCCTGCAAGCTTTTATCCA	AACGCTCCGAGACACTGTAG
ROCK2	Ratón	CTCATCCGAGACCCTCGCTC	ATGCCTTATGACGAACCAACTGA
IFN- γ	Ratón	ACCTGTGGGTTGTTGACCTC	GAGGAACTGGCAAAGGATGG
TNF- α	Ratón	ATAGCAAATCGGCTGACGGT	CCCTCACACTCACAAACCAC
IL-10	Ratón	GGGGAGAAATCGATGACAGC	GGTTGCCAAGCCTTATCGGA
IL-4	Ratón	CTGTGGTGTCTTCGTTGCTG	CCATATCCACGGATGCGACA
GAPDH	Ratón	CTAGGACTGGATAAGCAGGGC	GCCAAATCCGTTACACCGA

9. Extracción de ADN plasmidial

La cepa competente de *Escherichia coli* (*E. coli*) DH5 α fue cultivada en medio Luria Broth (5 o 200 mL) toda la noche en agitación a 37°C. Las células fueron centrifugadas a 7000 x g y la extracción de ADN plasmidial se realizó mediante el kit QIAprep® Spin Miniprep (para 5 mL de cultivo) o el kit EndoFree® Plasmid Maxi Kit (para 200 mL de cultivo) siguiendo las instrucciones del fabricante. El ADN plasmidial fue eluido en agua libre de nucleasa, y la concentración fue determinada usando un espectrofotómetro NanoDrop™.

10. PCR para subclonamiento

Para el subclonamiento de ROCK-1 (1-420) y ROCK-2 (1-436) desde los plasmidios pCAG y pXJ40, respectivamente, los sitios de restricción fueron agregados a los genes mediante los partidores de la **Tabla 3**. Para ROCK-1 fue utilizado el kit *illustra*™ puRETAq Ready-To-Go PCR Beads (GE Healthcare). Se usaron 25

pmoles de cada partidor y 50 pg de DNA templado (pCAG-ROCK-1). Los ciclos del PCR están especificados en la **Tabla 4**. Para ROCK-2 fue utilizada la Phusion® High-Fidelity DNA Polymerase. El mix de PCR se realizó según la **Tabla 5**, y los ciclos de PCR están descritos en la **Tabla 6**.

Tabla 3. Partidores utilizados para subclonamiento de ROCK-1 y ROCK-2

<i>Partidor</i>	<i>Secuencia (5'→3')</i>
KpnI-ROCK-1(1-420) For	TTATGGTACCTAATGTCGACTGGGGACAGT
KpnI-ROCK-1(1-420) Rev	TTAAGGTACCGCTCATGCATTGGAGCTAGTTC
XhoI-HA-ROCK-2(1-436) For	AATACTCGAGAATATGTACCCATACGACG
KpnI-ROCK-2(1-436) Rev	ATTAGGTACCAATTCAAATCTCCTGACTTTCTTC

Tabla 4. Ciclos de PCR para subclonamiento de ROCK-1

<i>Paso</i>	<i>Temperatura</i>	<i>Tiempo</i>	<i>N° de ciclos</i>
Denaturación inicial	95°C	5 minutos	1
Denaturación	95°C	1 minuto	
Alineamiento	57°C	30 segundos	35
Extensión	73°C	2 min, 32 seg	
Extensión final	73°C	5 minutos	1
Mantención	4°C	Hasta el almacenamiento	1

Tabla 5. Componentes del mix de PCR para ROCK-2

<i>Componente</i>	<i>Volumen (µL)</i>	<i>Concentración Final</i>
Agua libre de nucleasas	31.5	
Buffer HF 5X	10	1X
dNTPs 10 mM	1	200 µM
Forward 10 µM	2.5	0.5 µM

Reverse 10 μ M	2.5	0.5 μ M
pXJ40-HA-ROCK-2 (3 ng/ μ L)	2	0.12 ng/ μ L
ADN Polimerasa	0.5	1 Unidad

Tabla 6. Ciclos de PCR para subclonamiento de ROCK-2

<i>Paso</i>	<i>Temperatura</i>	<i>Tiempo</i>	<i>N° de ciclos</i>
Denaturación	98°C	3 minutos	1
Denaturación	98°C	10 segundos	
Alineamiento	55°C	30 segundos	35
Extensión	72°C	40 segundos	
Extensión final	73°C	5 minutos	1
Mantención	4°C	Hasta almacenamiento	1

11. Digestión con Enzimas de Restricción

Las enzimas de restricción KpnI y XhoI fueron usadas con el Buffer 1. El ADN plasmidial (5 μ g) fue digerido incubándolo con 1 μ L de cada enzima y 1 μ L de Buffer 1 durante 4 horas a 37°C. Luego, los productos de digestión y los controles no digeridos fueron analizadas en un gel de agarosa al 1%.

12. Electroforesis en gel de agarosa

El ADN fue analizado mediante separación por tamaño en geles de agarosa al 1% con Gelred. Las muestras fueron mezcladas con Buffer de carga 6X y cargadas en el gel. Para estimar el tamaño de los fragmentos de ADN, se cargaron 6 μ L de Ladder. La electroforesis fue llevada a cabo a 50 V por 2 horas, y visualizada bajo luz ultravioleta.

13. Extracción de ADN desde gel de agarosa

Los productos de PCR digeridos por enzimas de restricción fueron visualizados usando luz UV de baja intensidad (254 nm). Las bandas fueron cortadas usando un bisturí estéril. Los pedazos de gel fueron transferidos a tubos de 1.5 mL donde se pesaron. La extracción fue realizada con el QIAEX II Gel Extraction Kit (QIAGEN), siguiendo las indicaciones del fabricante. El ADN fue eluido con agua libre de nucleasas.

14. Ligación de ADN

Los productos de PCR digeridos y extraídos desde el gel de agarosa y los plasmidios digeridos fueron ligados usando la enzima T4 DNA Ligase (MERCK), usando el buffer de ligación del fabricante a 16°C por 16 horas.

15. Transformación de *E. coli*

Se añadieron 10 µL del resultado de ligación a un tubo de 1.5 mL con 50 µL de bacterias *E. coli* DH5α competentes y se incubó en hielo por 30 min. Las bacterias fueron sometidas a estrés por calor a 42°C durante 20 segundos y puestas en hielo por 2 minutos. Se añadieron 950 µL de medio LB libre de antibiótico a cada tubo y se incubó a 37°C por 1 hora en agitación. Luego, 20 µL de cada tubo fueron plaqueados en placas LB agar con ampicilina, e incubadas a 37°C por 12 horas.

16. Secuenciación

La secuenciación del ADN plasmidial fue llevada a cabo en Eurofins, usando partidores cuyas secuencias se especifican en la **Tabla 7**.

Tabla 7. Secuencia de partidores para secuenciación de plasmidios lentivirales creados

<i>Partidor</i>	<i>Secuencia (5'→3')</i>
GFP Forward	GACCCAACGAGAAGCG

ROCK-1 Forward middle	GCTATGAAGCTTCTCAG
ROCK-1 Forward end	GAATGTGACTGGTGG
ROCK-2 Forward middle	GTCCGTGGGTGGTTC
ROCK-2 Forward end	GCTCCAGTGGTGCC

17. Producción de Lentivirus y Transducción de células U937

Los vectores portadores del gen de interés (pSEW, pSEW-ROCK-1(1-420) y pSEW-ROCK-2(1-436)), el plasmidio gag-pol (pΔ8.91) y el plasmidio codificante de VSVG (pMDM2-G) fueron extraídos desde la cepa de *E. coli* DH5α como fue descrito previamente. Se transfectaron 4 μg de pSEW, 2 μg de pΔ8.91 y 1 μg de pMDM2.G usando 21 μL de polietilenimina (PEI, 1 μg/μL). Los plasmidios y el PEI fueron mezclados con 500 μL de OptiMEM e incubados por 15 minutos a temperatura ambiente. La mezcla fue añadida a un frasco de cultivo de 25 cm² con células HEK293T al 80% de confluencia con 2 mL de medio RPMI 10% SBF. Luego de 72 horas, se extrajo el sobrenadante, se filtró con un filtro de 45 μm y se guardó -80°C hasta su uso. 2x10⁴ células U937 fueron centrifugadas a 90 x g durante 5 minutos y resuspendidas en 200 μL de sobrenadante viral. Las células con virus fueron centrifugadas a 400 xg por 40 minutos. Luego de la centrifugación, las células y los virus fueron sembradas en una placa de 24 pocillos con 800 μL de medio RPMI suplementado. 72 horas después, se observaron las células transducidas por microscopía y citometría de flujo (GFP+).

18. Análisis estadístico

Los resultados están expresados como el promedio de los datos ± desviación estándar (SD). Para analizar a normalidad de los datos, se realizó la prueba de Shapiro-Wilk. Los datos con distribución normal fueron analizados por ANOVA, seguido de un post-test según corresponda para comparar entre las distintas condiciones experimentales y con los respectivos controles. Los datos sin distribución normal fueron analizados mediante la prueba de Kruskal-Wallis,

seguida por la prueba de Dunn para realizar comparaciones múltiples. Los valores de $p < 0.05$ fueron considerados estadísticamente significativos. Todos los análisis estadísticos se realizaron con el software Prism 9 (GraphPad Software).

RESULTADOS

1. *T. cruzi* activa a ROCK en macrófagos humanos vía TLR4

Para evaluar el efecto de la infección con *T. cruzi* sobre la actividad de ROCK, se infectaron células U937 con *T. cruzi* Dm28 a distintos tiempos, usando un MOI 1:1. La determinación de la actividad enzimática se realizó mediante Western Blot. La proteína fosfatasa de la cadena liviana de la miosina (MYPT) es fosforilada en la posición T696 por ROCK-1 y ROCK-2, por lo que es utilizada como marcador de activación de estas quinasas. El efecto de *T. cruzi* sobre la actividad de estas quinasas fue evaluado mediante la razón entre la MYPT fosforilada (p-MYPT) y la MYPT total. Además, se determinaron los niveles proteicos de ROCK-1 y ROCK-2 para identificar si el efecto del parásito era sobre la activación y/o la expresión de ROCK. Se observó que a los 30 minutos de infección con *T. cruzi* existe un máximo de activación de ROCK, mientras que la expresión de ROCK-1 y ROCK-2 no varía significativamente en el tiempo ni en respuesta a la infección (**Figura 9A**). Esto nos indica que la infección con *T. cruzi* produce un cambio en la actividad enzimática de ROCK-1 y/o ROCK-2 en tiempos cortos, y no en su expresión, en esta ventana de tiempo.

A pesar de que la fosforilación de MYPT en T696 es ampliamente utilizada como marcador de actividad enzimática de ROCK, esta fosforilación puede ser efectuada también por otras quinasas como PKA y PKG [104, 105]. Para comprobar que en este modelo de infección con *T. cruzi* es ROCK quien está fosforilando a MYPT, se midió la fosforilación en presencia del compuesto Y-27632, inhibidor de ROCK-1 y ROCK-2, el que se une al sitio de unión a ATP del dominio quinasa de ROCK-1 y ROCK-2 [106]. Y-27632 disminuyó significativamente la fosforilación de MYPT (**Figura 9B**). Esto nos permite concluir que la infección con *T. cruzi* produce un aumento en la actividad enzimática de ROCK en tiempos cortos.

La activación de macrófagos inducida por *T. cruzi* ocurre principalmente a través de receptores tipo Toll (TLR) [107], de los cuales TLR4 está involucrado en la expresión

de citoquinas proinflamatorias inducida por el parásito [108]. Para determinar si TLR4 media la activación de ROCK inducida por *T. cruzi*, los macrófagos U937 fueron incubados con el inhibidor de TLR4 TAK-242 por 1 hora, y luego infectados con *T. cruzi* por 30 minutos. La activación de ROCK fue determinada mediante western blot midiendo la razón entre MYPT fosforilado y total. TAK-242 disminuyó significativamente la activación de ROCK inducida por el parásito (**Figura 9C**). Este resultado indica que TLR4 es un receptor río arriba de la activación de ROCK inducida por *T. cruzi*.

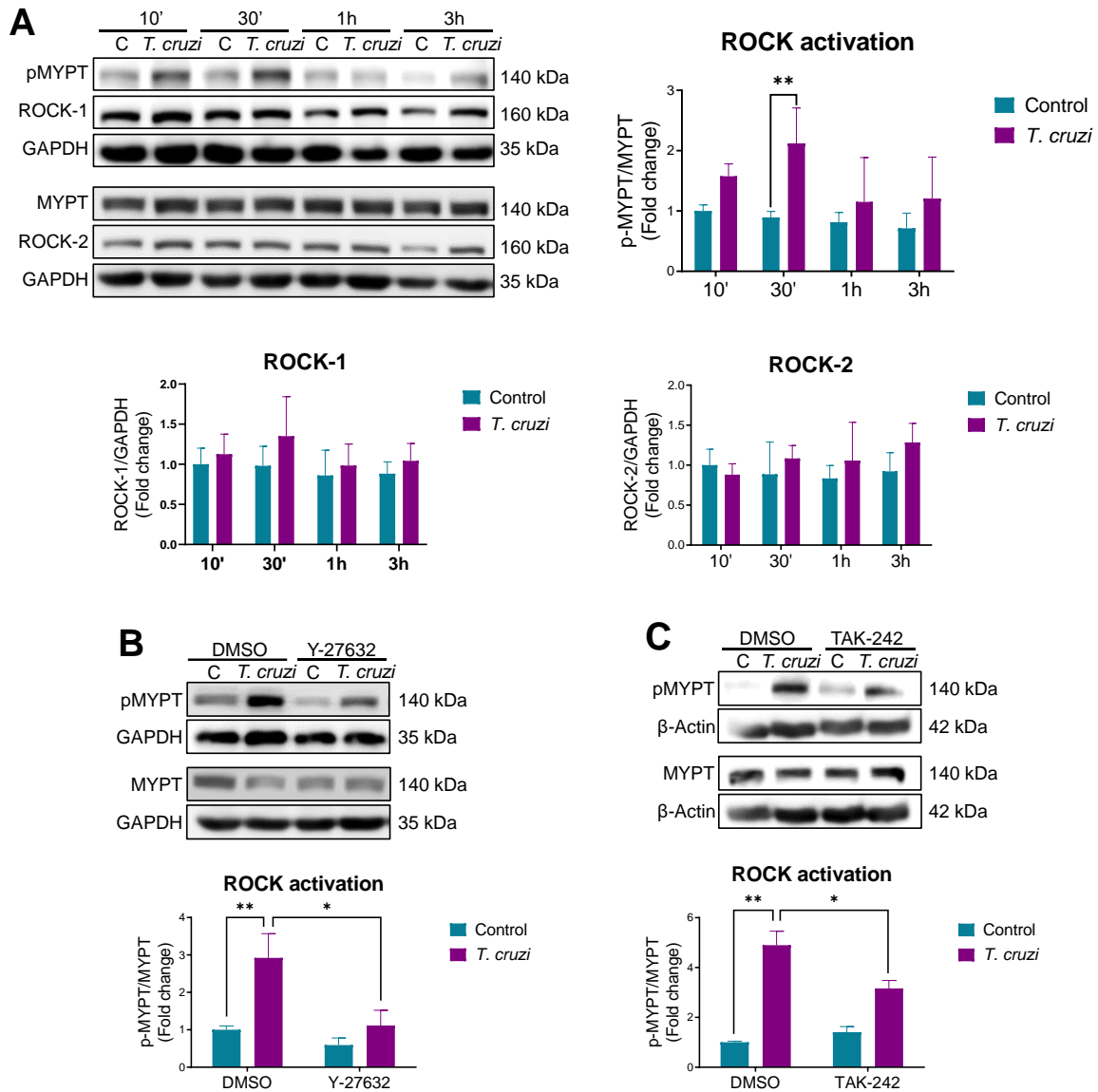


Figura 9. Activación y expresión ROCK en macrófagos infectados con *T. cruzi*. (A) Las células U937 se incubaron con la cepa Dm28 de *T. cruzi* o control sin infección durante 10 minutos, 30 minutos, 1 hora y 3 horas. Se muestra una imagen representativa del western blot de p-MYPT (marcador de activación ROCK-1 y ROCK-2), MYPT total, ROCK-1, ROCK-2 y GAPDH (control de carga). (B) Las células U937 se incubaron con el inhibidor de ROCK Y-27632 (10 μ M) o vehículo (DMSO 0.1%) durante 1 hora y luego se infectaron con la cepa Dm28 de *T. cruzi* o control durante 30 minutos. Se muestra una imagen representativa y gráfico del western blot de p-MYPT, MYPT total y GAPDH (control de carga). (C) Las células U937 se incubaron con el inhibidor de TLR4 TAK-242 (10 μ M) o vehículo (DMSO 0.1%) durante 1 hora y luego se infectaron con la cepa Dm28 de *T. cruzi*

o control durante 30 minutos. Se muestra una imagen representativa del Western Blot y gráfico de p-MYPT, MYPT total y GAPDH (control de carga). Los gráficos representan la densitometría de las bandas de Western Blot, y muestran la media \pm SD (n = 3). *p<0.05 **p<0,01 analizado por la prueba de Kruskal-Wallis y de Dunn.

2. ROCK media la activación del factor nuclear kappa B (NF- κ B) inducida por *T. cruzi*

NF- κ B es un factor de transcripción clave en la expresión de mediadores proinflamatorios. Se ha demostrado que la activación de esta vía es vital para la síntesis de IL-1 β y otros mediadores proinflamatorios inducidos por la infección con *T. cruzi*, por lo que estudiamos el rol de ROCK en la activación de NF- κ B (P65). Las células U937 inducidas con PMA fueron tratadas con i) Y-27632, ii) el inhibidor de la traslocación nuclear de P65 (JSH-23, 30 μ M), iii) el inhibidor de TLR4 (TAK-242, 10 μ M) o, iv) el vehículo (DMSO 0,1%) por 1 hora, y luego incubadas con *T. cruzi* por 30 minutos. La activación de NF- κ B fue determinada por Western Blot midiendo la relación entre la proteína P65 fosforilada (pP65) y total, y la localización nuclear de P65 fue determinada mediante inmunofluorescencia. La infección con *T. cruzi* indujo la fosforilación y localización nuclear de P65, mientras que la inhibición de ROCK con Y-27632 previno la activación del factor de transcripción (**Figura 10**). Como se esperaba, la incubación con JSH-23 no redujo la fosforilación, pero si la localización nuclear de P65, y la inhibición de TLR4, conocido regulador río arriba de NF- κ B, impidió ambas. Estos resultados sugieren que ROCK es un mediador importante de la activación de P65 inducida por *T. cruzi*.

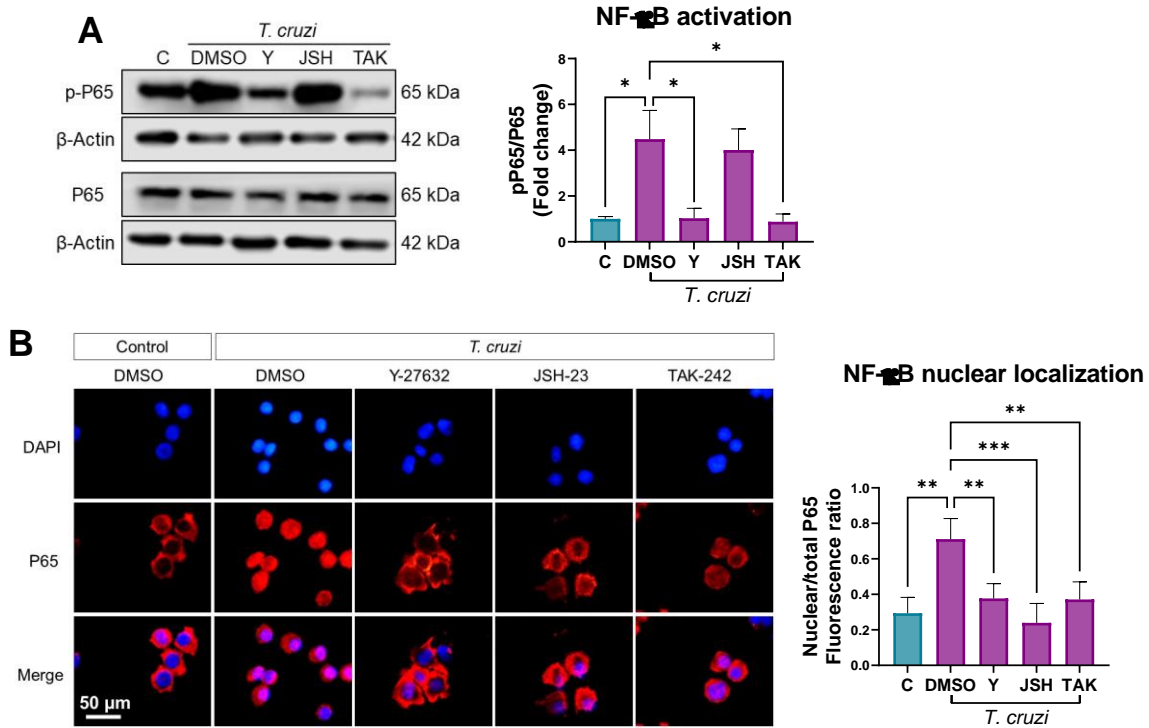


Figura 10. La inhibición de ROCK impide la fosforilación y localización nuclear de P65 en macrófagos infectados con *T. cruzi*. Las células U937 inducidas con PMA fueron tratadas con el inhibidor de ROCK (Y-27632, 10 μM), el inhibidor de la traslocación nuclear de P65 (JSH-23, 30 μM), el inhibidor de TRL4 (TAK-242, 10 μM) o el vehículo (DMSO 0,1%) por 1 hora, y luego infectadas con *T. cruzi* por 30 minutos. **(A)** La activación de NF-κB fue determinada por western blot midiendo la relación entre la proteína P65 fosforilada y total. **(B)** Imágenes representativas de la localización nuclear de P65 fue determinada mediante inmunofluorescencia usando microscopía de epifluorescencia para visualizar los cambios. Dapi fue utilizado para marcar el núcleo celular (azul). La cuantificación de la razón entre la fluorescencia nuclear y total fue realizada mediante ImageJ. Los gráficos muestran la media ± SD de 3 experimentos independientes. *p<0.05 analizado por la prueba de Kruskal-Wallis y de Dunn.

3. ROCK está implicado en la polarización de macrófagos inducida por *T. cruzi*

Dado que se observó que la activación de ROCK por *T. cruzi* gatilla la activación de NF-κB, se prosigió a evaluar el rol de esta activación sobre la expresión y secreción

de citoquinas en macrófagos humanos. Se evaluó la expresión de ARNm y la secreción de marcadores de macrófagos M1 (IL-6, IL-1 β , TNF- α e IFN- γ) y M2 (IL-10, IL-4, TGF- β y Arg-1) en células U937 tratadas con el inhibidor de ROCK, Y-27632, o el vehículo (DMSO 0,1%) por 1 hora y a continuación incubadas con *T. cruzi* durante 30 minutos (tiempo de mayor activación de ROCK). El ARN fue extraído 6 horas post-infección para el RT-qPCR, y el sobrenadante fue extraído 24 horas post-infección para las determinaciones multiplex. La infección con *T. cruzi* produjo un aumento de la síntesis de ARNm y de la liberación de todos los marcadores M1, lo que fue prevenido por la inhibición de ROCK (**Figura 11A**). Esto sugiere que ROCK tiene un rol importante en la síntesis de citoquinas proinflamatorias a tiempos cortos de infección con *T. cruzi*.

Por otro lado, la infección con *T. cruzi* aumentó la expresión de los marcadores M2, mientras que Y-27632 produjo efectos variados (**Figura 11B**). La inhibición de ROCK produjo el aumento en la síntesis de ARNm de IL-10, TGF- β y Arg-1, mientras que indujo una disminución de la secreción de IL-10 e IL-4. Al haber una disminución en la secreción tanto de marcadores M1 como M2 en los macrófagos tratados con Y-27632, se evaluó la relación entre la secreción de IL-6 y TNF- α (M1) e IL-10 o IL-4 (M2). La **Figura 11C** muestra que la relación IL-6/IL-10, TNF- α /IL-10, IL-6/IL-4, TNF- α /IL-4 aumenta con la infección con *T. cruzi*, y disminuye al inhibir ROCK con Y-27632.

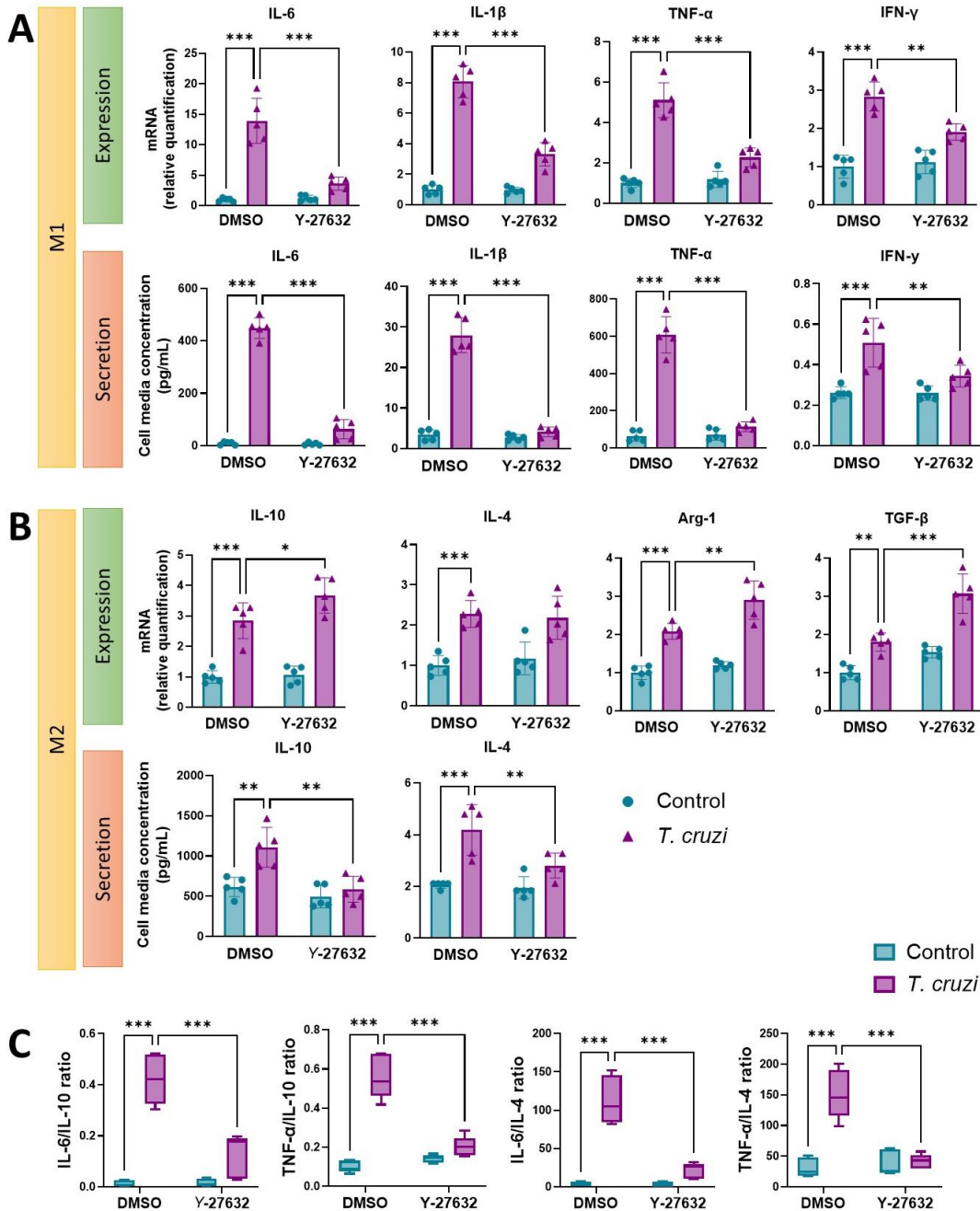


Figura 11. La inhibición de ROCK produce un cambio en la síntesis de citoquinas en macrófagos infectados con *T. cruzi*. Los macrófagos U937 se incubaron con el inhibidor de ROCK Y-27632 o el vehículo (DMSO 0,1%) por 1 hora, y luego se infectaron con la cepa Dm28 de *T. cruzi*. Luego de 30 minutos de incubación con *T. cruzi*, los parásitos fueron retirados y las células se dejaron en medio fresco por 6 horas para extraer el ARN y realizar

RT-qPCR, o 24 horas para medir los niveles de citoquinas secretadas mediante LUMINEX. **(A)** Determinación de marcadores M1. **(B)** Determinación de marcadores M2. **(C)** Razón entre los niveles de citoquinas proinflamatorias e IL-10 o IL-4. La prueba de normalidad de Shapiro-Wilk comprobó que los datos tienen una distribución normal. Los gráficos muestran la media \pm SD de 5 experimentos independientes. * $p < 0.05$ ** $p < 0.01$ *** $p < 0.001$ analizado por ANOVA de dos vías y post-test de Tukey.

4. Atorvastatina inhibe la activación de ROCK inducida por *T. cruzi*

Luego de identificar el rol de ROCK en la polarización de macrófagos infectados con *T. cruzi*, se prosiguió a evaluar la capacidad de atorvastatina para inhibir la activación de ROCK inducida por *T. cruzi*. Para esto, los macrófagos humanos U937 fueron incubados con atorvastatina a distintas concentraciones (0,1 μ M, 1 μ M, 10 μ M) o con vehículo (DMSO 0.1%) durante 24 horas, y luego se infectaron con *T. cruzi* por 30 minutos. Se evaluó la activación (p-MYPT/MYPT total) y expresión de ROCK-1 y ROCK-2 mediante western blot. El IC₅₀ de atorvastatina para la línea U937 fue de $102,5 \pm 8,7 \mu$ M, y a todas las concentraciones usadas, la viabilidad fue de un 100%). Se observó que la activación de ROCK inducida por *T. cruzi* disminuye a medida que aumenta la concentración de atorvastatina (**Figura 12A**). A su vez, atorvastatina no modificó los niveles proteicos de ROCK-1 ni ROCK-2 (**Figura 12B-C**). Por lo tanto, la atorvastatina fue capaz de inhibir la activación de ROCK inducida por *T. cruzi* de manera dosis-dependiente, sin afectar su expresión.

Para determinar cambios en la expresión de ROCK a tiempos largos, los macrófagos U937 fueron tratados con atorvastatina (10 μ M) o vehículo (DMSO 0,1%) por 24 horas. Luego, se infectaron con *T. cruzi* por 30 minutos. El ARN total fue extraído 24 horas post-infección con *T. cruzi* para el análisis por RT-qPCR. La incubación con el parásito aumentó los niveles de ARNm de ROCK-1 (**Figura 12D**). Aunque el ARNm de ROCK-2 mostró una tendencia a aumentar, ésta no fue estadísticamente significativa ($p=0.09$) (**Figura 12E**). Sin embargo, la atorvastatina disminuyó de manera significativa el ARNm de ROCK-1 y de ROCK-2 en los macrófagos infectados. Por lo tanto, atorvastatina puede prevenir los efectos de *T.*

cruzi, inhibiendo su actividad a tiempos cortos (30 min), y disminuyendo su expresión a tiempos largos (24 h).

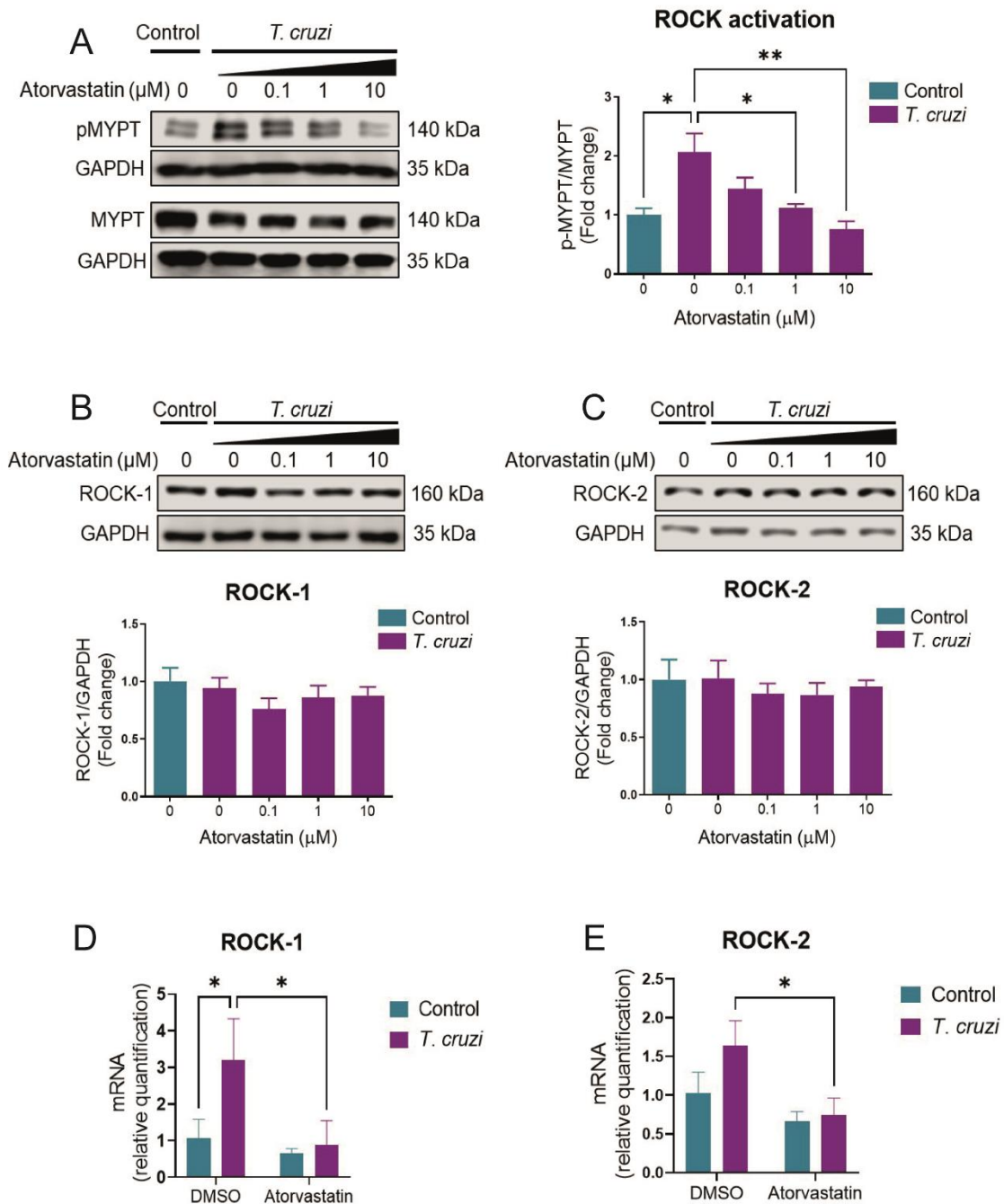


Figura 12. Atorvastatina disminuye la activación y expresión de ROCK en macrófagos infectados con *T. cruzi*. Las células U937 inducidas con PMA se trataron con DMSO (0,1%) o atorvastatina (0,1, 1, 10 μM) por 24 horas, y se infectaron con la cepa Dm28 de *T. cruzi* por 30 minutos. Luego, se extrajo las proteínas y se analizó por western blot la

activación de ROCK **(A)** y los niveles proteicos de ROCK-1 **(B)** y de ROCK-2 **(C)**. Luego de 24 horas postinfección, se extrajo el ARN total para determinar los niveles de ARNm de ROCK-1 **(D)** y de ROCK-2 **(E)**. Los gráficos muestran la media \pm SD de 3 experimentos independientes. * $p < 0.05$ ** $p < 0.01$ analizado por la prueba de Kruskal-Wallis y de Dunn.

5. Atorvastatina induce un cambio en la polarización de macrófagos infectados con *T. cruzi*

Luego de determinar que atorvastatina es capaz de inhibir a ROCK, estudió su efecto sobre la polarización de macrófagos. Los macrófagos U937 fueron incubados con atorvastatina 10 μ M o DMSO 0,1% por 24 horas, y luego fueron infectados con *T. cruzi* durante 30 minutos. Luego de 6 horas postinfección, se extrajo el ARN para medir la expresión de marcadores M1 y M2 mediante RT-qPCR, y luego de 24 horas postinfección, se extrajo el sobrenadante para determinar la secreción de los marcadores mediante un ensayo Multiplex.

Al igual que en la **Figura 11**, *T. cruzi* indujo un aumento de la expresión y secreción de todos los marcadores M1 y M2 (**Figura 13**). El tratamiento con atorvastatina disminuyó significativamente la expresión y secreción de todos los marcadores proinflamatorios (**Figura 13A**), mientras que no tuvo ningún efecto en los marcadores M2, a excepción de la expresión de arginasa-1 y TGF- β , en los que aumentó sus niveles de ARNm (**Figura 13B**). Al determinar la relación entre marcadores M1 y M2, se puede observar que *T. cruzi* induce una polarización tipo M1, mientras que atorvastatina cambia el balance hacia una M2 (**Figura 13C**).

El efecto de atorvastatina observado sobre la expresión de marcadores M1 y M2 coincide con el del inhibidor de ROCK Y-27632, lo que sugiere que ROCK tiene un rol importante en el efecto de atorvastatina; sin embargo, es necesario comprobar esta observación con la expresión de ROCK-1 y ROCK-2 constitutivamente activos en estas células.

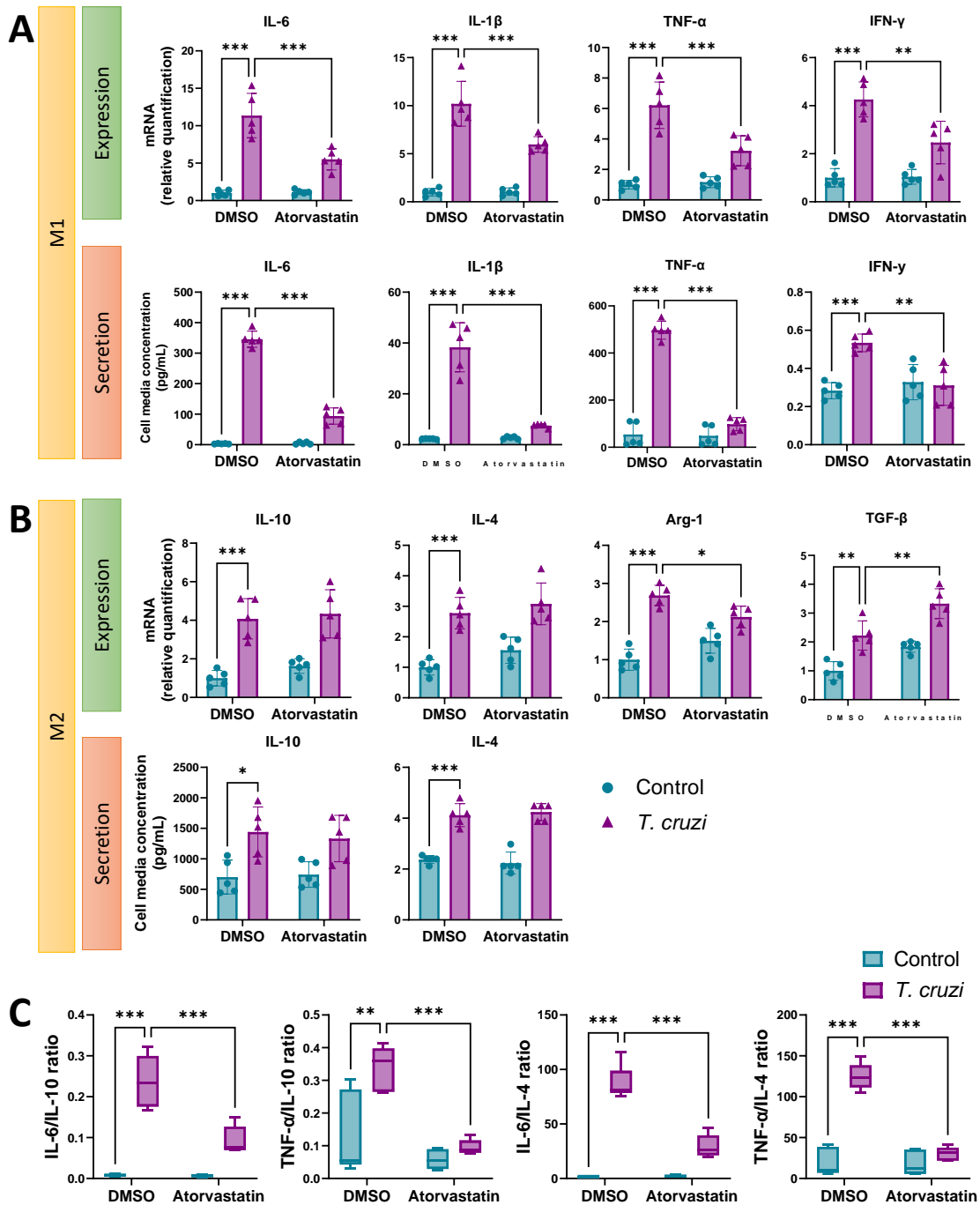


Figura 13. Atorvastatina cambia la expresión de marcadores M1 y M2 en macrófagos infectados con *T. cruzi*. Los macrófagos U937 se incubaron con atorvastatina 10 μ M o el vehículo (DMSO 0,1%) por 24 horas, y luego se infectaron con la cepa Dm28 de *T. cruzi*. Luego de 30 minutos de incubación con *T. cruzi*, los parásitos fueron retirados y las células se dejaron en medio fresco por 6 horas para extraer el ARN y realizar RT-qPCR, o 24 horas para medir los niveles de citoquinas secretadas mediante LUMINEX. **(A)** Determinación de

marcadores M1. **(B)** Determinación de marcadores M2. **(C)** Razón entre los niveles de citoquinas proinflamatorias e IL-10 o IL-4. La prueba de normalidad de Shapiro-Wilk comprobó que los datos tienen una distribución normal. Los gráficos muestran la media \pm SD de 5 experimentos independientes. * $p < 0.05$ ** $p < 0.01$ *** $p < 0.001$ analizado por ANOVA de dos vías y post-test de Tukey.

6. Expresión constitutiva de ROCK-1 y ROCK-2 en macrófagos humanos

Para conocer la relación entre la inhibición de ROCK y los cambios en la síntesis de citoquinas, se crearon células U937 con expresión estable de ROCK-1 o ROCK-2 constitutivamente activos (CA). Para esto se usaron lentivirus, los que son generados por transfección de tres plásmidos en la línea celular HEK293T:

- (i) un plásmido de expresión que contiene la secuencia de empaquetamiento *psi* (Ψ) y el transgen flanqueado por los LTRs para permitir la integración
- (ii) un plásmido de empaquetamiento que codifica lo necesario para el core, la replicación viral (*gag*), la retrotranscripción (*pol*), la integración al DNA (*rev*), los genes virales *tat*, y el elemento de respuesta a *rev* (RRE), y
- (iii) un plásmido con el gen de envoltura VSV-G.

En este trabajo se utilizó el plásmido pSEW como plásmido de expresión. pSEW fue sintetizado por Demaison y cols., quienes cambiaron el promotor CMV (que está silenciado en monocitos) del plásmido pCEW por el promotor SFFV [109]. pSEW contiene el 5' y 3' LTR, el promotor SFFV, el gen de eGFP, el elemento regulatorio WPRE, y un gen de resistencia a ampicilina. Para el subclonamiento de genes de ROCK fueron usadas dos enzimas de restricción: XhoI y KpnI, las cuales fueron identificadas en pSEW por secuenciación mediante un partidor Forward complementario a eGFP (5'- GACCCCAACGAGAAGCG-3'), como se muestra en la **Figura 14**.

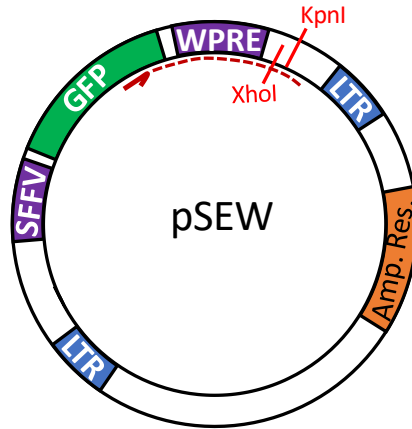


Figura 14. Esquema del plasmidio pSEW. En azul se muestran los LTR, en morado el promotor SFFV y el elemento WPRE, en verde el gen de eGFP, y en naranja el gen de resistencia a ampicilina. La flecha roja muestra el partidor utilizado, y la línea roja segmentada muestra el resultado de la secuenciación. En rojo se muestra la ubicación de los sitios de restricción de XhoI y KpnI, que están separados por 17 pb.

6.1. Subclonamiento de ROCK-1 y ROCK-2 constitutivamente activos en pSEW

ROCK-1 y ROCK-2 son quinasas que se encuentran en su estado inactivo cuando el dominio de unión a Rho (RBD) está plegado sobre el dominio quinasa inhibiéndolo, y se activa cuando Rho-GTP se une a RBD, liberando el dominio quinasa (**Figura 15A**). Debido a esto, para tener proteínas constitutivamente activas, se les truncó su C-terminal eliminando el RBD, quedando ROCK-1 1-420 y ROCK-2 1-436 (**Figura 15B**). Estas formas constitutivamente activas de ROCK-1 y ROCK-2 han sido previamente descritas [110, 111].

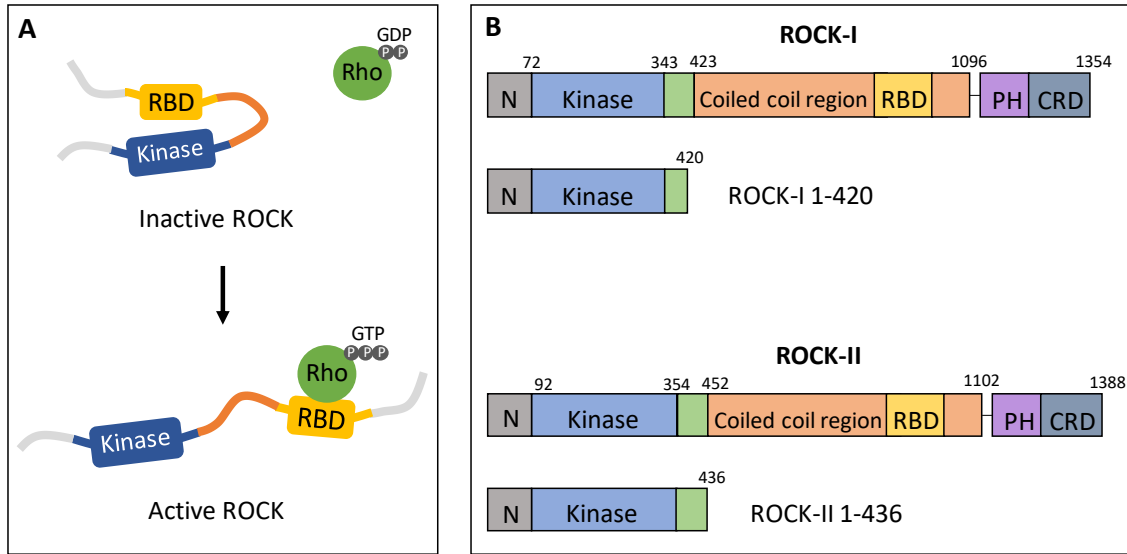


Figura 15. Esquema de ROCK-1 y ROCK-2. (A) Esquema de activación de ROCK por unión de Rho-GTP al dominio de unión a Rho (RBD). **(B)** Esquema de estructura completa y truncada de ROCK-1 y ROCK-2.

6.1.1. ROCK-1

El subclonamiento de ROCK-1 se llevó a cabo desde el plasmidio pCAG-ROCK-1(1-420) al cual se le agregó sitios de restricción de KpnI antes del codón de inicio, y luego del nucleótido 1260 mediante PCR, como se observa en la **Figura 16**. La correcta amplificación de este gen se determinó mediante un gel de agarosa al 1%, el cual mostró una banda al tamaño correspondiente (**Figura 17A**). Tanto el producto de PCR como el plasmidio fueron digeridos con KpnI y ligados con T4 ligasa. El producto de la ligación fue transformado en *E. coli* DH5 α , para luego aislar colonias y extraer los plasmidios. La colonia con el inserto fue identificada mediante digestión con KpnI. De todas las colonias, solo una tuvo el inserto (**Figura 17B**). Esa colonia se secuenció y se corroboró que el plasmidio tuviera el inserto correcto en la ubicación correcta.

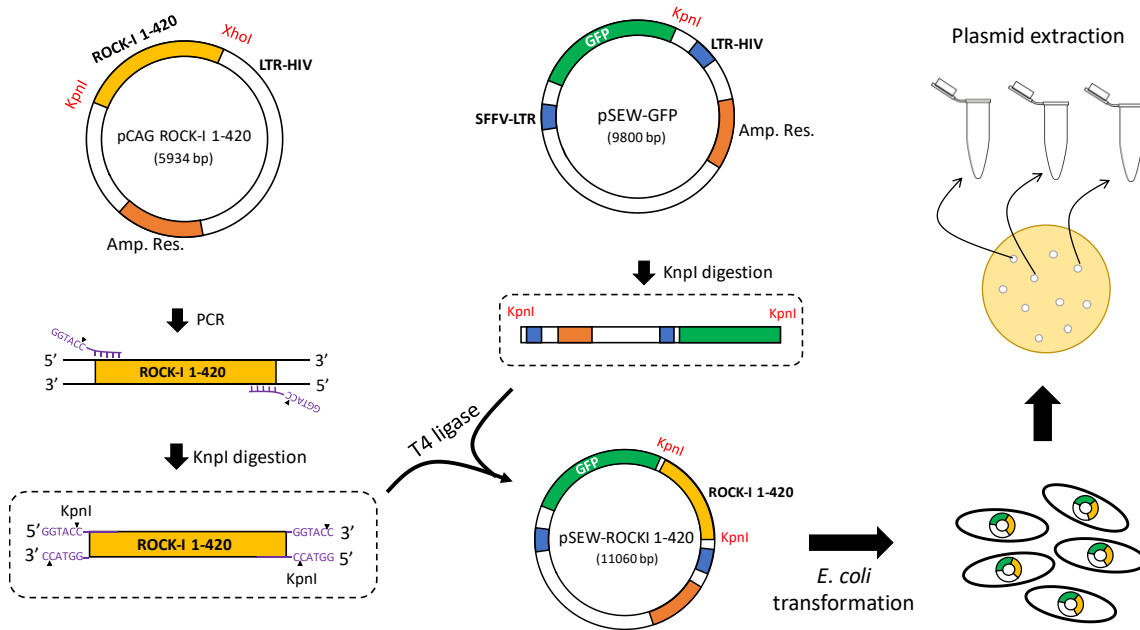


Figura 16. Esquema de subclonamiento de ROCK-1 desde pCAG hacia pSEW. Los sitios de restricción de KpnI (GGTACC) fueron agregados en el extremo 5' de los partidores diseñados para amplificar ROCK-1 1-420. El producto de PCR y pSEW fueron digeridos con KpnI, ligados con T4 ligasa y transformados en *E. coli* DH5 α . *E. coli* fue plaqueada para luego aislar las colonias y extraer los plasmidios.

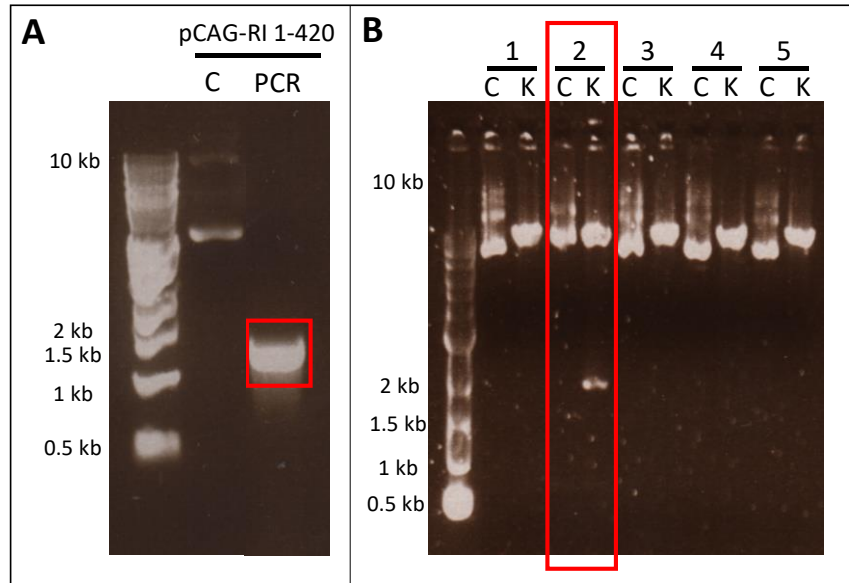


Figura 17. Geles de ROCK-1. (A) Electroforesis en gel de agarosa al 1% del producto de amplificación del plasmidio pCAG-ROCK. Se puede ver el plasmidio pCAG-ROCK-1 antes del PCR (C) y luego del PCR (PCR). Se observan las múltiples bandas del plasmidio completo correspondiente a sus estados de superenrollamiento, y al lado y marcado en rojo la única banda del producto de PCR. **(B)** Electroforesis en gel de agarosa al 1% del producto de amplificación del plasmidio pCAG-ROCK extraído de las colonias transformadas. Los carriles C corresponden a los productos de amplificación de los plasmidios sin digerir, y los K son los mismos clones con los plasmidios digeridos con KpnI. Marcado con rojo está el único clon (número 2) que mostró dos bandas al ser digerido, lo que significa que ese plasmidio tiene ROCK-1 1-420 insertado en pSEW.

6.1.2. ROCK-2

El subclonamiento de ROCK-2 difiere del de ROCK-1 en dos aspectos:

- i) Para ROCK-2 se usaron 2 enzimas de restricción (XhoI y KpnI) para asegurar que quedara posicionado en la orientación correcta.
- ii) A ROCK-2 se le agregó un HA-tag para poder identificarlo por inmunoensayos.

El gen de ROCK-2 se obtuvo del plasmidio pXJ40-HA-ROCK-2, el cual se amplificó por PCR con un partidor Forward complementario a HA y con la secuencia de

restricción para XhoI, y otro partidor Reverse complementario a ROCK-2 (hasta el nucleótido 1308) y con la secuencia de restricción para KpnI, como se esquematiza en la **Figura 18**. La **Figura 19A** muestra la única banda del producto de PCR que fue digerida con XhoI y KpnI al igual que pSEW. Estos dos productos de la digestión fueron ligados, transformados y aislados de la misma manera que ROCK-1. Las bandas de la **Figura 19B** demuestran que todas las colonias de ROCK-2 tenían el plasmidio pSEW con ROCK-2(1-436) integrado.

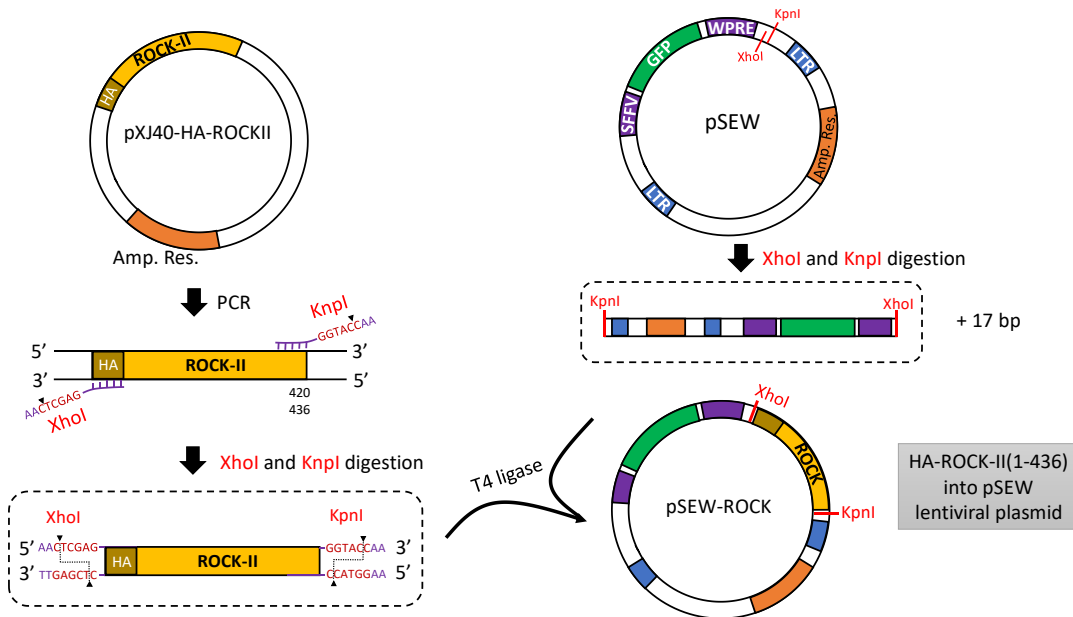


Figura 18. Esquema de subclonamiento de ROCK-2 desde pXJ40-HA-ROCK-2 hacia pSEW. Los sitios de restricción de XhoI (CTCGAG) y KpnI (GGTACC) fueron agregados a los extremos 5' y 3' del gen de ROCK-2, respectivamente, mediante PCR. El producto de PCR y pSEW fueron digeridos con XhoI y KpnI, ligados con T4 ligasa y transformados en *E. coli* DH5 α . *E. coli* fue plaqueada para luego aislar las colonias y extraer los plasmidios.

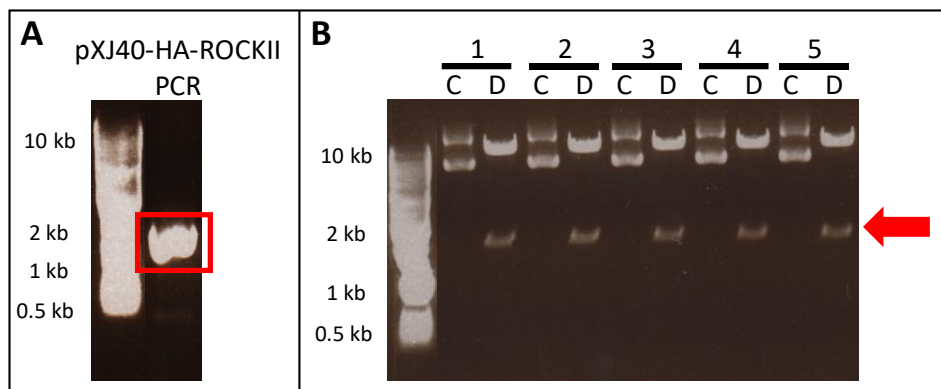


Figura 19. Geles de ROCK-2. **(A)** Electroforesis en gel de agarosa 1% del producto de amplificación del plasmidio pXJ40-HA-ROCK-2. Se puede observar la banda del plasmidio pXJ40-HA-ROCK-2 luego del PCR, correspondiente a ~1.7 kb. **(B)** Electroforesis en gel de agarosa al 1% del producto de amplificación de los plasmidios pXJ40-HA-ROCK-2 extraídos de las colonias transformadas. Los carriles C son los plasmidios sin digerir, y los D son los mismos clones con los plasmidios digeridos con XhoI y KpnI. La flecha roja muestra que todas las colonias extraídas poseen una banda a ~1.7 kb que corresponde al inserto.

6.2. Expresión estable de ROCK-1 (1-420) y ROCK-2 (1-436) en células U937

Luego de tener los plasmidios pSEW (control vector vacío), pSEW-ROCK-1(1-420) y pSEW-ROCK-2(1-436) secuenciados y confirmados, se prosiguió a expresarlos en las células U937. Para la expresión estable de estas proteínas se sintetizaron lentivirus mediante la transfección de células HEK293T con pSEW (plasmidio de expresión), pΔ8.91 (plasmidio de empaquetamiento) y pMD2.G (plasmidio VSV-G) para luego transducir las células U937 según lo detallado en materiales y métodos. Se evaluó la expresión de proteínas de las células control (sin transducir), pSEW (vector sólo con GFP, sin transgen), pSEW-ROCK-1(1-420) y pSEW-ROCK-2(1-436) mediante western blot (**Figura 20A**). Tanto ROCK-1 como ROCK-2 endógeno (gen completo) se mantuvieron constantes en las 4 condiciones. ROCK-2(1-436) fue detectado mediante el anticuerpo anti-HA y ROCK-1(1-420) fue detectado mediante un anticuerpo anti-N-terminal de ROCK-1. No sólo se observa la expresión de ambas proteínas truncadas (40 kDa aprox.), sino también la figura muestra que

estas células tienen mayor expresión de pMYPT, lo que demuestra mayor activación de ROCK. Además, en el western blot se muestra la expresión de GFP de la misma manera que la imagen de microscopía (**Figura 20B**).

Las células U937 expresando ROCK-1 y ROCK-2 constitutivamente activos (CA) demostraron no ser inhibidos por atorvastatina al ser infectados con *T. cruzi* (**Figura 20C**). Además, la estabilidad de la expresión de GFP fue determinada mediante citometría de flujo, durante los pasajes utilizados en los experimentos. La población de células GFP⁺ fue mayor al 95% en todos los pasajes utilizados, comprobando que es una expresión estable (**Figura 21**).

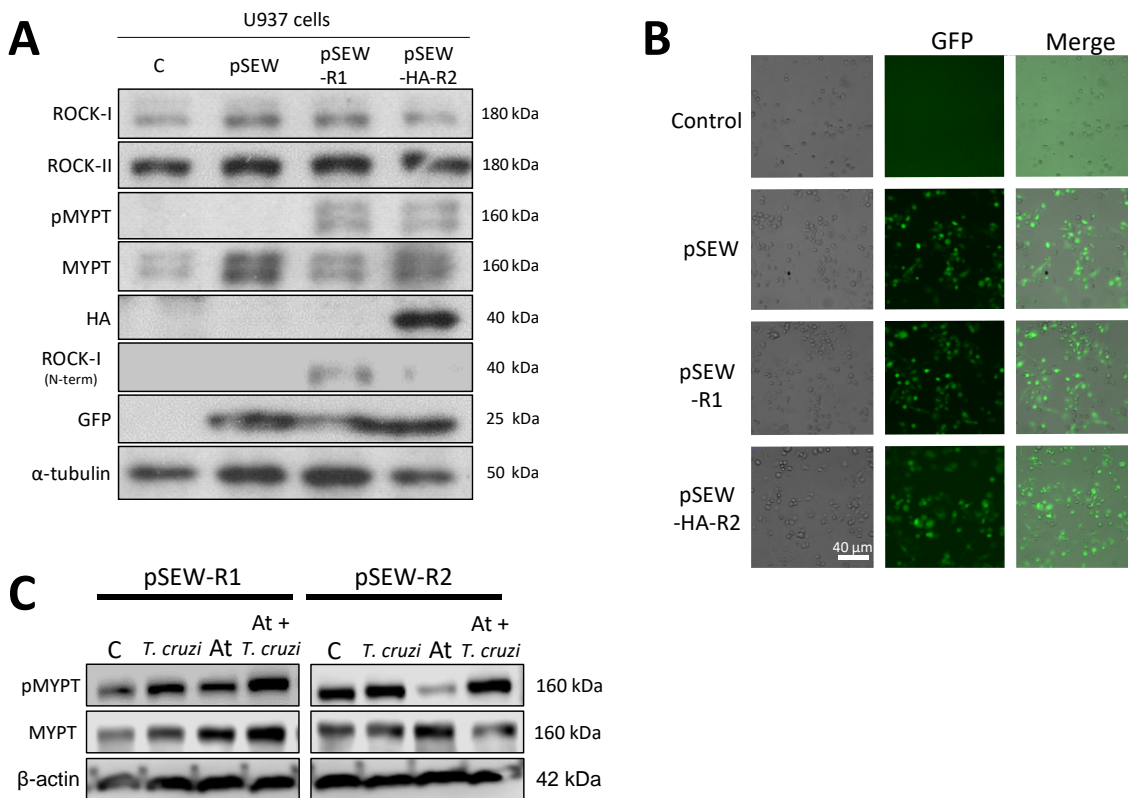


Figura 20. Confirmación de expresión de proteínas en células U937. (A) Inmuno Blot que muestra la expresión de ROCK-1, ROCK-2, su activación (p-MYPT/MYPT), formas truncadas de ROCK-1 (N-term) y ROCK-2 (HA), y GFP, y (B) Imágenes microscópicas de células U937 no transducidas (Control, C), o transducidas con pSEW, pSEW-ROCK-1(1-420) (expresado como pSEW-R1), o pSEW-HA-ROCK-2(1-436) (expresado como pSEW-HA-R2). (C) Los macrófagos U937 GFP, ROCK-1 CA y ROCK-2 CA fueron tratados con

atorvastatina 10 μ M por 24 horas, y luego infectados con la cepa Dm28 de *T. cruzi* por 30 minutos. La activación de ROCK fue determinada por Western Blot midiendo la razón entre pMYPT y MYPT total.

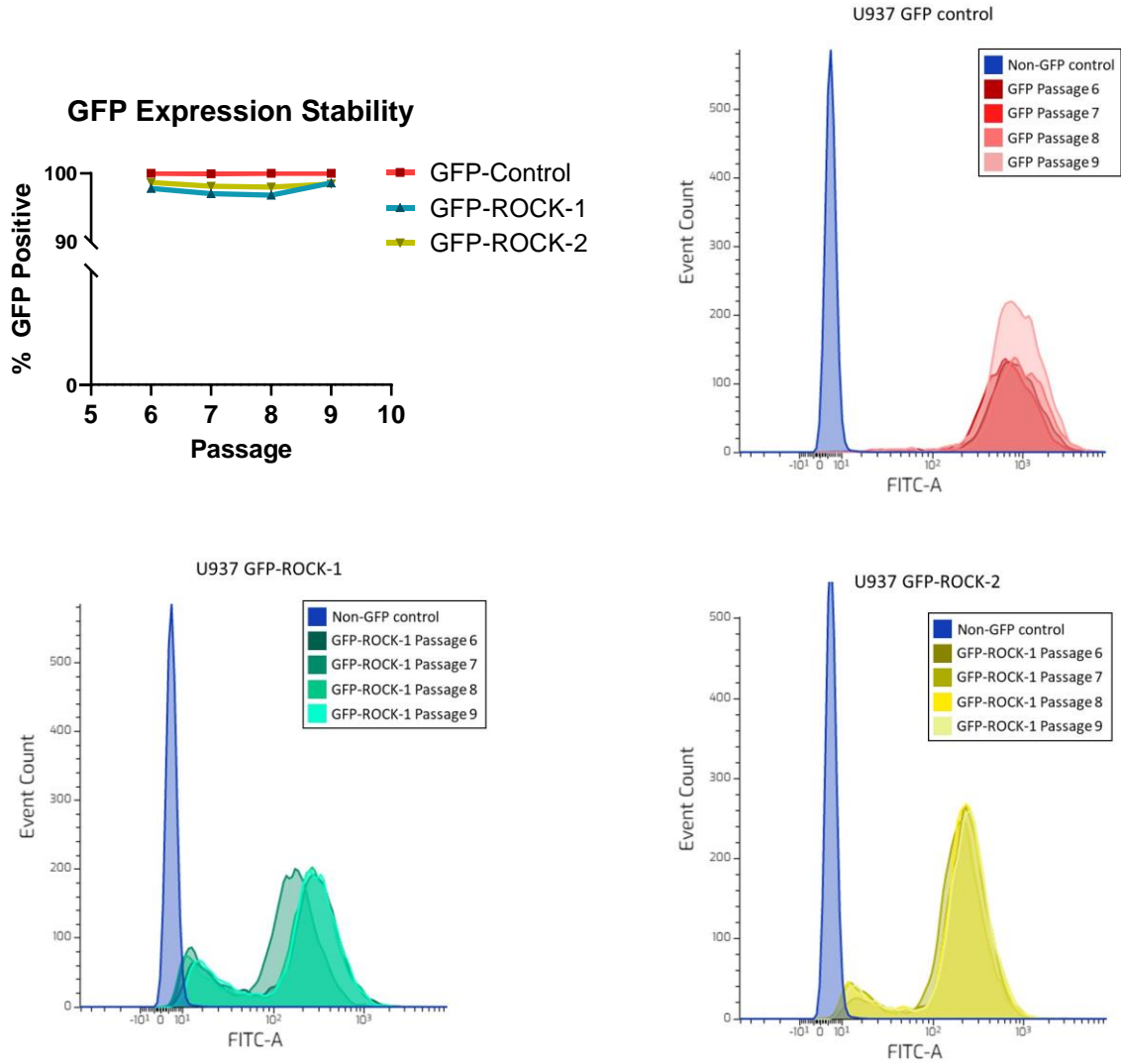


Figura 21. Estabilidad de la transducción de células U937. Las células fueron recolectadas en sus pasajes 6, 7, 8 y 9, en los cuales se realizaron los experimentos, y se les determinó la expresión de GFP mediante citometría de flujo. El gráfico muestra el porcentaje de células GFP positivas de cada grupo celular cuantificados desde los histogramas.

7. La inhibición de ROCK cumple un rol importante en el efecto antiinflamatorio de atorvastatina inducido en macrófagos infectados con *T. cruzi*

Luego de generar las líneas celulares con expresión estable de ROCK-1 y ROCK-2 constitutivamente activos (CA), se midió la expresión y secreción de marcadores M1 en células incubadas con atorvastatina de la misma forma anteriormente descrita. La **Figura 22** muestra la expresión y secreción de los marcadores M1 en células GFP, ROCK-1 CA, y ROCK-2 CA. Se puede observar que atorvastatina disminuye los niveles de todas las citoquinas proinflamatorias, en las células GFP control, pero que este efecto no se aprecia en las células con ROCK CA.

Ni atorvastatina, ni la expresión constitutiva de ROCK cambió la síntesis de ARNm o la secreción de las citoquinas antiinflamatorias IL-10 e IL-4 frente a la infección con *T. cruzi* (**Figura 23**). Sin embargo, atorvastatina aumentó los niveles de ARNm de Arg-1 y TGF- β en células infectadas, lo que fue prevenido por la expresión constitutiva de ROCK-1 y ROCK-2. Finalmente, la expresión constitutiva de ROCK-1 y ROCK-2 evita que atorvastatina modifique la relación entre citoquinas proinflamatorias e IL-10 o IL4 producida por la infección (**Figura 24**).

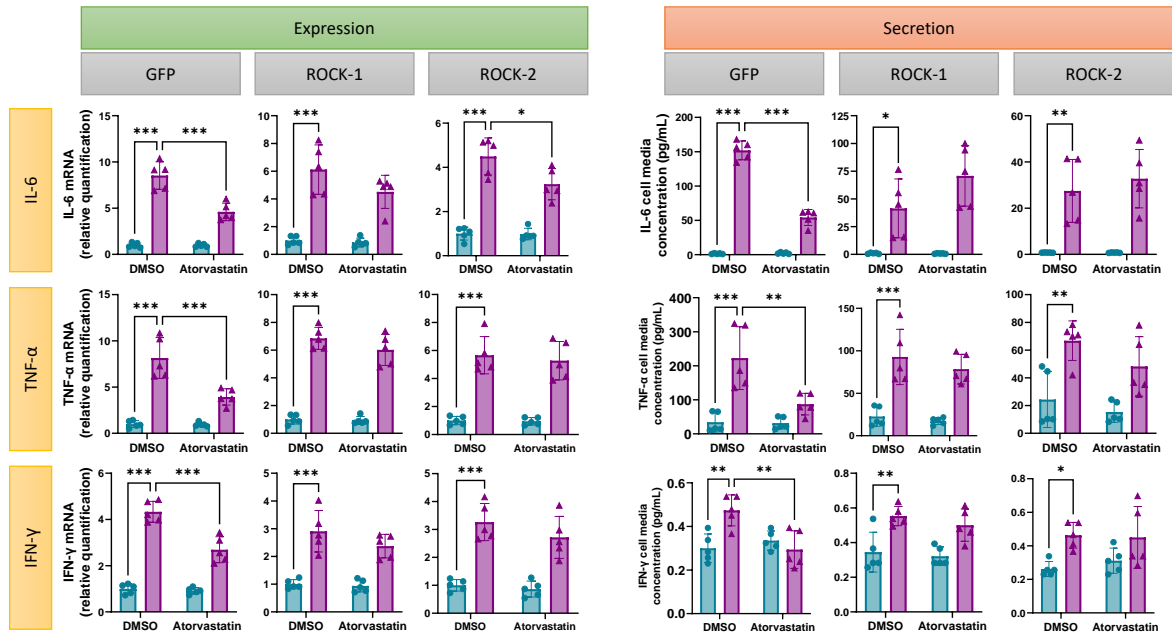


Figura 22. La inhibición en la expresión y secreción de marcadores M1 por atorvastatina es prevenido en células expresando ROCK-1 y ROCK-2 constitutivamente activos. Los macrófagos U937 se incubaron con atorvastatina 10 μ M o vehículo (DMSO 0,1%) por 24 horas, y luego se infectaron con la cepa Dm28 de *T. cruzi*. Luego de 30 minutos de infección, los parásitos fueron retirados y las células se dejaron con medio fresco por 6 horas para extraer el ARN y realizar RT-qPCR (“*expression*”), o 24 horas para medir los niveles de citoquinas secretadas mediante LUMINEX (“*secretion*”). La prueba de normalidad de Shapiro-Wilk comprobó que los datos tienen una distribución normal. Los gráficos muestran la media \pm SD de 5 experimentos independientes. * $p < 0.05$ ** $p < 0.01$ *** $p < 0.001$ **** $p < 0.0001$ ns= $p > 0.05$ analizado por ANOVA de dos vías y post-test de Tukey.

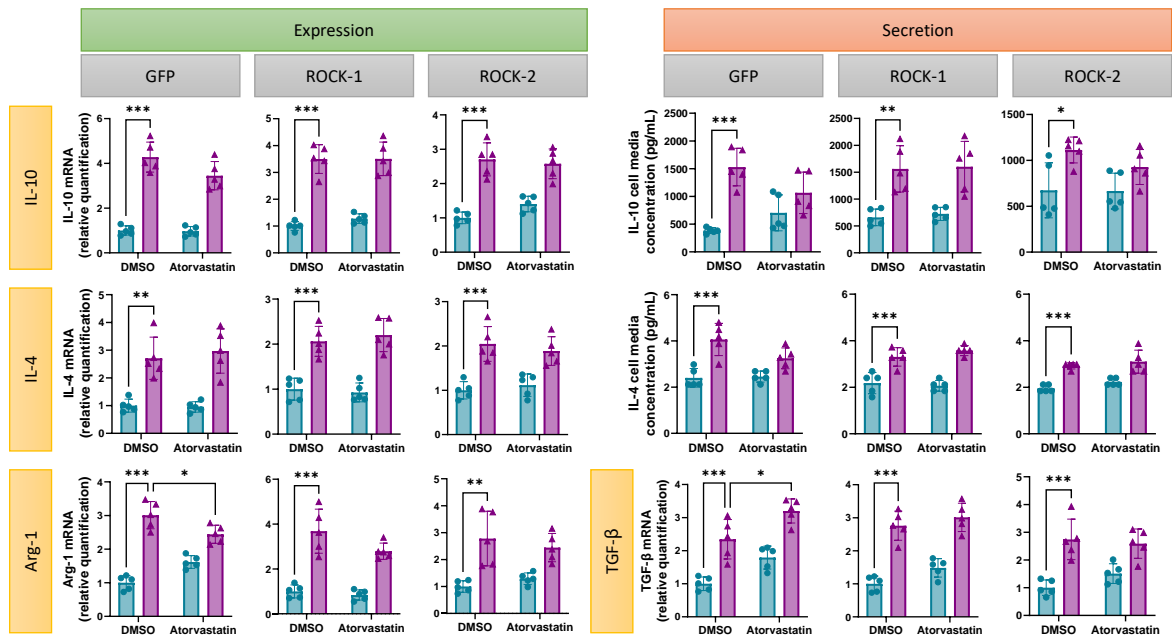


Figura 23. Atorvastatina modula la expresión, pero no la secreción de marcadores M2. Los macrófagos U937 se incubaron con atorvastatina 10 μ M o vehículo (DMSO 0,1%) por 24 horas, y luego se infectaron con la cepa Dm28 de *T. cruzi*. Luego de 30 minutos de infección, los parásitos fueron retirados y las células se dejaron con medio fresco por 6 horas para extraer el ARN y realizar RT-qPCR (“*expression*”), o 24 horas para medir los niveles de citoquinas secretadas mediante LUMINEX[®] (“*secretion*”). La prueba de normalidad de Shapiro-Wilk comprobó que los datos tienen una distribución normal. Los gráficos muestran la media \pm SD de 5 experimentos independientes. * $p < 0.05$ ** $p < 0.01$ *** $p < 0.001$ analizado por ANOVA de dos vías y post-test de Tukey.

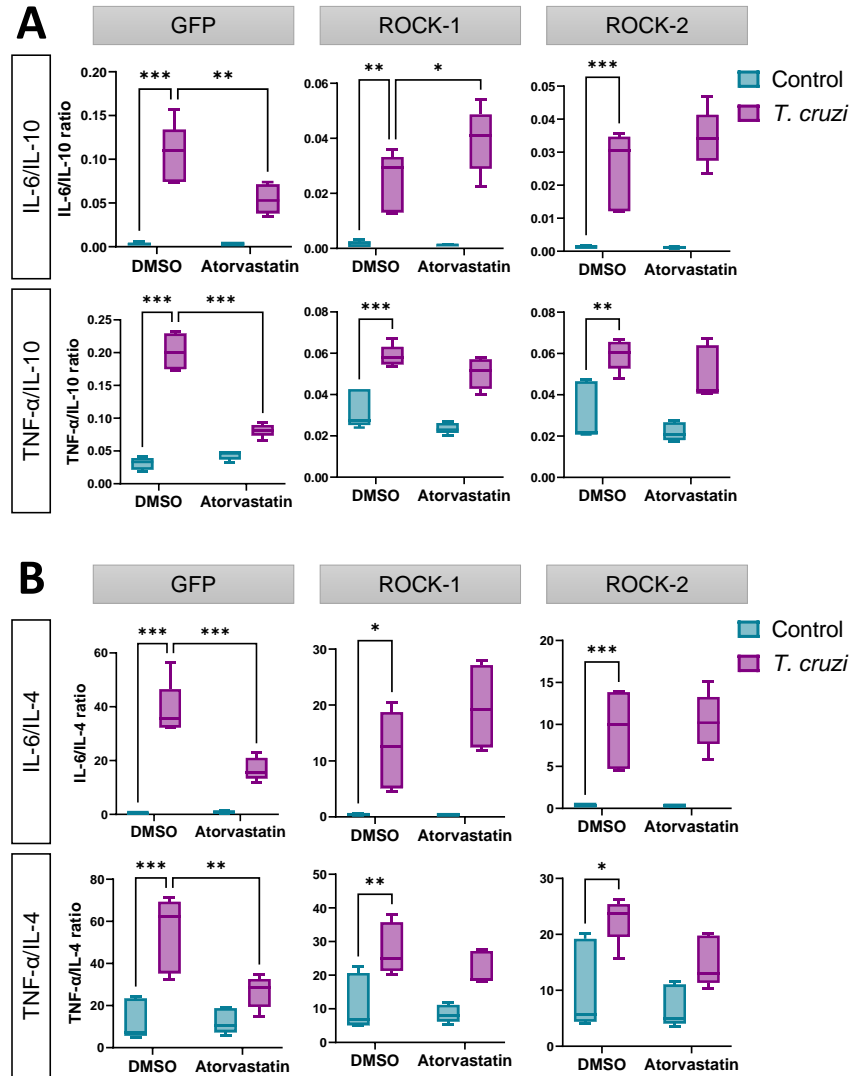


Figura 24. La expresión constitutiva de ROCK-1 y ROCK-2 previene efecto antiinflamatorio de atorvastatina en macrófagos incubados con *T. cruzi*. Los macrófagos U937 se incubaron con atorvastatina 10 μ M o vehículo (DMSO 0,1%) por 24 horas, y luego se infectaron con *T. cruzi* por 30 min. Luego de 24 horas se midieron los niveles de citoquinas secretadas mediante LUMINEX®. (A) Razón entre IL-6 y TNF- α e IL-10. (B) Razón entre IL-6 y TNF- α e IL-4. La prueba de normalidad de Shapiro-Wilk comprobó que los datos tienen una distribución normal. Los gráficos muestran la media \pm SD de 5 experimentos independientes. * $p < 0.05$ ** $p < 0.01$ *** $p < 0.001$ analizado por ANOVA de dos vías y post-test de Tukey.

Previamente se ha demostrado que las estatinas disminuyen la activación de NF- κ B en modelos de infección con *T. cruzi* [96]. Además, en este trabajo observamos que ROCK tiene un rol importante en la activación de este factor proinflamatorio inducido por *T. cruzi*. Debido a lo anterior es que estudiamos si la inhibición de ROCK está involucrada en el efecto de atorvastatina sobre NF- κ B. Los macrófagos U937 GFP, ROCK-1 CA y ROCK-2 CA fueron tratados con atorvastatina 10 μ M por 24 horas, y luego infectados con *T. cruzi* por 30 minutos. La activación de NF- κ B fue evaluada por western blot, determinando la razón entre P65 fosforilado (pP65) y el total. **La Figura 25** muestra que atorvastatina previene la fosforilación de P65 en las células U937-GFP, pero no en las ROCK-1 ni ROCK-2 CA. De este modo, se confirma el rol de ROCK en el efecto antiinflamatorio de atorvastatina.

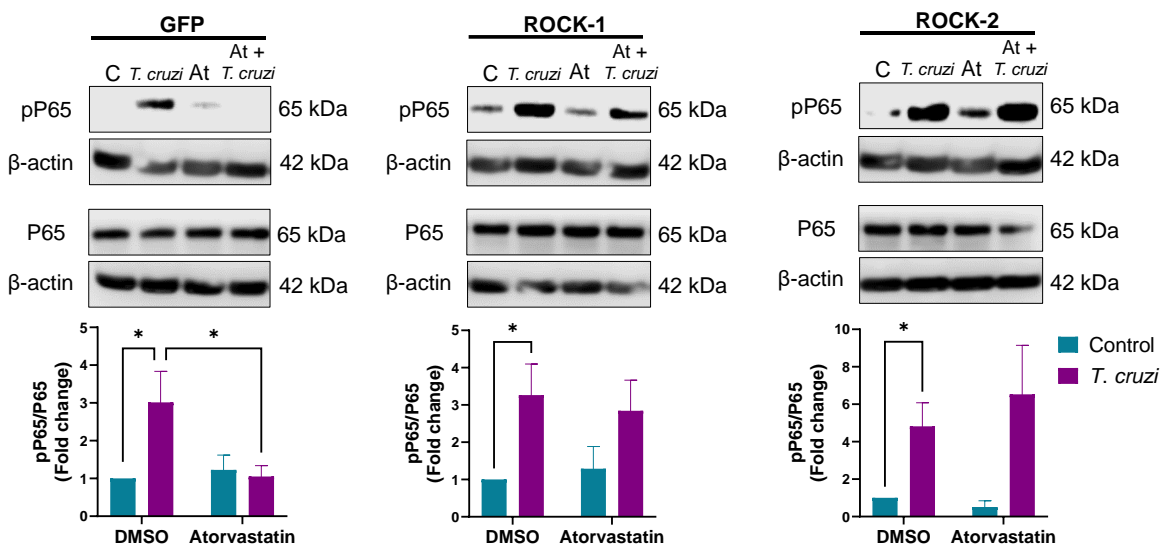


Figura 25. La expresión de ROCK constitutivamente activo previene el efecto antiinflamatorio de atorvastatina en macrófagos incubados con *T. cruzi*. Los macrófagos U937 (GFP, ROCK1-CA y ROCK2-CA) se incubaron con atorvastatina 10 μ M o vehículo (DMSO 0,1%) por 24 horas, y luego se infectaron con la cepa Dm28 de *T. cruzi* por 30 minutos. La activación de NF- κ B fue evaluada mediante Western Blot, midiendo la relación entre P65 fosforilada y la total (pP65/P65). Los gráficos muestran la media \pm SD de 3 experimentos independientes. *p < 0.05 analizado por la prueba de Kruskal-Wallis y de Dunn.

8. La secreción de citoquinas inducida por atorvastatina en macrófagos infectados con *T. cruzi* reduce la activación de células endoteliales microvasculares cardiacas humanas.

La activación endotelial es un proceso importante en la patogénesis de la CCC, ya que induce el reclutamiento de leucocitos y subsecuente infiltración en tejido cardiaco. Luego de determinar que atorvastatina modifica la polarización de macrófagos infectados con *T. cruzi* mediante la inhibición de ROCK, nos preguntamos cuál era el efecto de este cambio de fenotipo sobre la activación de células endoteliales cardiacas. Para evaluarlo, se recolectó el medio condicionado de los macrófagos tratados con atorvastatina (10 μ M) o DMSO (0,1%) e incubados con *T. cruzi* o medio de cultivo solo. El medio recolectado se cultivó con células HMVEC-C durante 6 horas para extraer RNA y medir la expresión moléculas de adhesión y quimioquinas de las células endoteliales por RT-qPCR, o durante 24 horas para medir la adhesión de las células endoteliales a monocitos que expresan GFP. Además, luego de las 24 horas de cocultivo con el medio condicionado, este se extrajo y se cambió por medio nuevo, el cual se mantuvo por 24 horas para la medición de citoquinas endoteliales.

El medio condicionado de los macrófagos infectados con *T. cruzi* (M1) indujo un aumento de los niveles de ARNm de las moléculas de adhesión ICAM-1, VCAM-1 y PECAM-1 (**Figura 26A**) y de la quimioquina MCP-1, también conocida como CCL2 (**Figura 26B**). Además, indujo la adhesión a monocitos, medido por fluorimetría (**Figura 26C**) y microscopía (**Figura 26D**), en conjunto con el aumento de la expresión de esas cuatro citoquinas. Finalmente, indujo la secreción de GM-CSF, IL-1 β , IL-6 y TNF- α (**Figura 26E**). Por otro lado, el medio condicionado de los macrófagos infectados con *T. cruzi* y tratados con atorvastatina indujo en menor grado la expresión de CAMs, la adhesión a monocitos y la secreción de citoquinas proinflamatorias, evidenciando un efecto reductor de la activación endotelial producto de los cambios en la polarización de macrófagos inducido por atorvastatina.

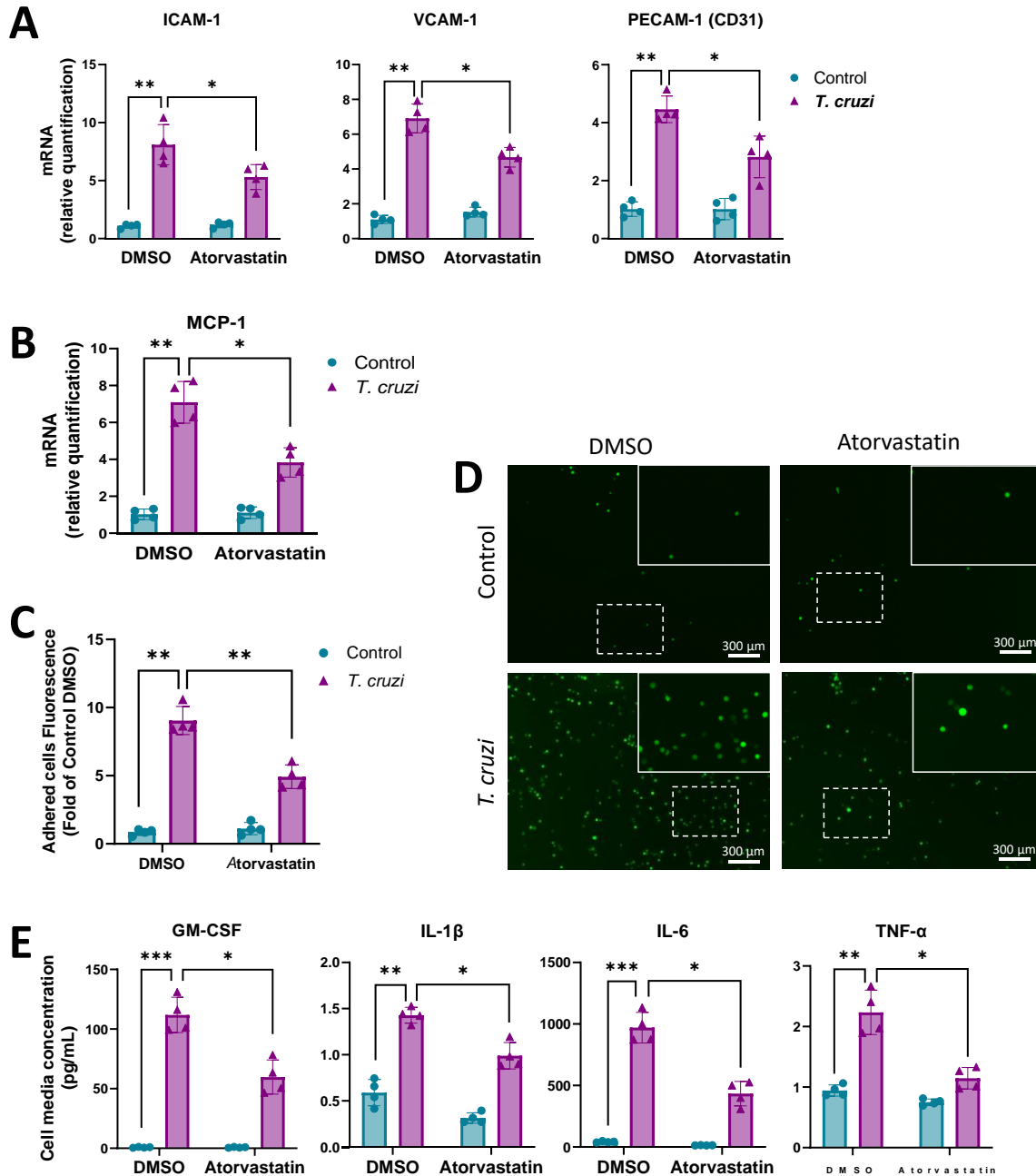


Figura 26. El medio condicionado de macrófagos tratados con atorvastatina e infectados con *T. cruzi* disminuye la activación de células endoteliales microvasculares cardiacas humanas. Los macrófagos U937 fueron tratados con atorvastatina (10 μM) o DMSO (0,1%) por 24 h, y luego infectados con *T. cruzi* por 30 min. 24 horas postinfección se extrajo el medio de cultivo de cada condición y se incubó con células endoteliales HMVEC-C por 6 horas para medir el ARNm de moléculas de adhesión (A) y MCP-1 (B), o por 24 horas para medir la adhesión a monocitos por fluorimetría (C) y

microscopía **(D)**, además de la secreción de citoquinas endoteliales mediante ensayo Multiplex **(E)**.

9. El tratamiento con simvastatina reduce la expresión y activación de ROCK y cambia el perfil de citoquinas en tejido cardiaco de ratones con CCC.

Luego de demostrar que el tratamiento con atorvastatina previene la activación y expresión de ROCK inducido por *T. cruzi* en macrófagos *in vitro*, estudiamos qué ocurre con ROCK cuando se administra simvastatina en ratones con EC. Además, debido a que observamos un efecto antiinflamatorio de atorvastatina, evaluamos la expresión de citoquinas proinflamatorias y antiinflamatorias en tejido cardiaco de ratones con CCC.

Como se observa en la **Figura 27A**, los ratones BALB/c se infectaron con 10^3 trypomastigotes Dm28 de *T. cruzi* por vía intraperitoneal. Al día 60 post-infección, y asegurándonos de estar en fase crónica [103], se administró simvastatina 1 mg/Kg/día por 20 días. Al día 80 post-infección, se extrajo los corazones para extraer el ARN y determinar los niveles de ARNm de ROCK y citoquinas, y también para realizar análisis histológicos. La infección con *T. cruzi* indujo un aumento en la expresión de ROCK-1. ROCK-2 tuvo una tendencia a aumentar que no fue estadísticamente significativa ($p=0.09$); mientras que el tratamiento con simvastatina redujo la expresión de ambas isoformas de ROCK (**Figura 27B**). El análisis realizado mediante inmunohistoquímica reveló que los ratones infectados tienen una mayor cantidad de MYPT fosforilado (marcador de activación de ROCK) en tejido cardiaco, lo que disminuye con el tratamiento con simvastatina (**Figura 27C**). Además, los ratones con CCC mostraron niveles altos de ARNm de citoquinas proinflamatorias (IFN- γ y TNF- α) y una disminución de la citoquina antiinflamatoria IL-10, mientras que el tratamiento con simvastatina disminuyó los niveles de citoquinas proinflamatorias y aumentó las antiinflamatorias (IL-10 e IL-4) (**Figura 27D**).

Para determinar la relación entre la expresión de ROCK-1 y ROCK-2 con la expresión de citoquinas, se realizó una correlación lineal entre los niveles de ARNm de estos, calculando el coeficiente de correlación de Pearson (r). Se observó que existe una correlación positiva entre los niveles de ROCK-1 e IFN- γ ; $r = 0.6488$ y TNF- α ; $r = 0.5151$. Por otro lado, la relación entre ROCK-1 con las citoquinas antiinflamatorias IL-10 e IL-4 corresponde a una correlación negativa, con valores de $r = -0.6181$ y $r = -0.5624$, respectivamente (**Figura 27E**). La única relación estadísticamente significativa para ROCK-2 fue la correlación negativa con IL-10; $r = -0.6273$. De este modo, se sugiere que simvastatina disminuye activación la expresión de ROCK y de citoquinas proinflamatorias, habiendo una relación positiva entre estas proteínas.

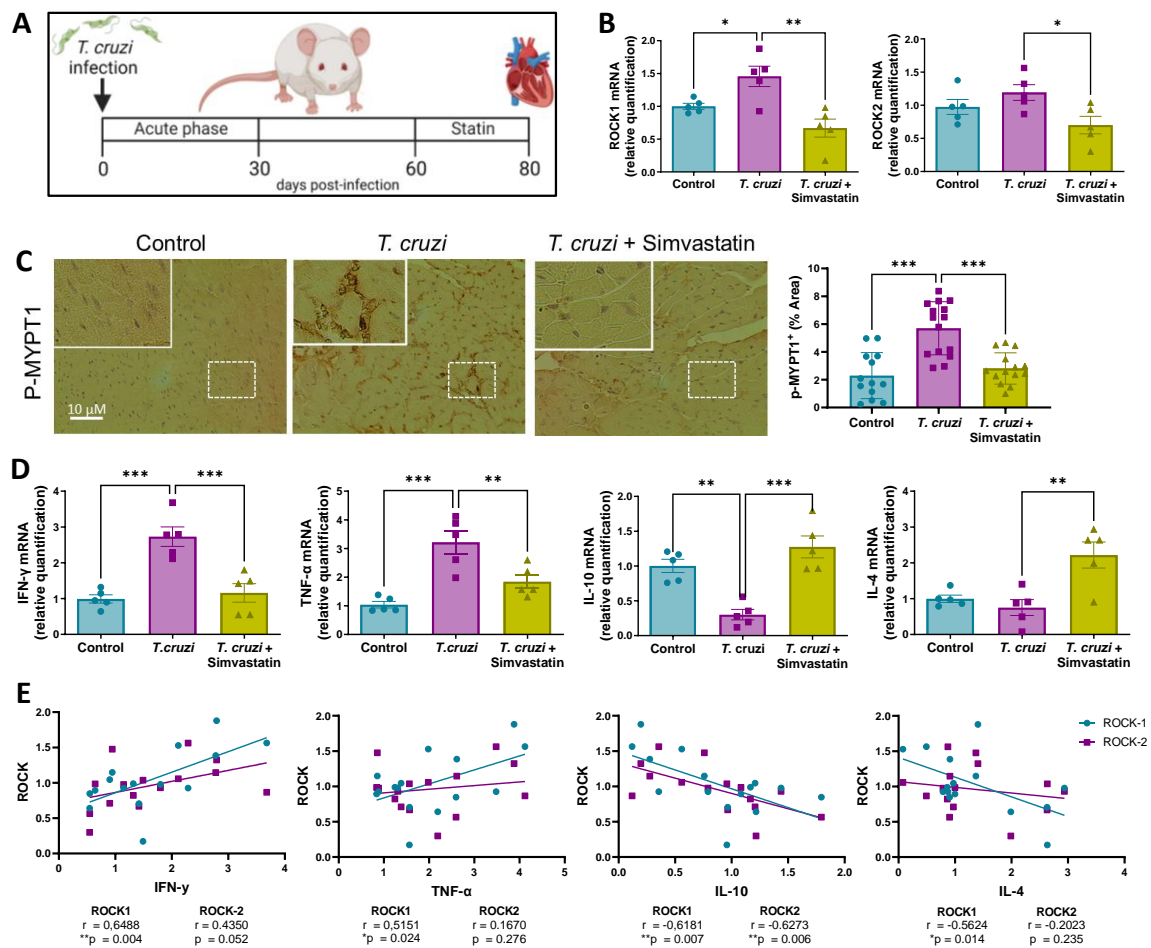


Figura 27. El tratamiento con simvastatina reduce la activación y expresión de ROCK y de citoquinas proinflamatorias en tejido cardiaco de ratones con CCC. Los ratones BALB/c fueron infectados con 10^3 trypomastigotes Dm28 de *T. cruzi* de forma intraperitoneal. Desde el día 60 post-infección, fueron tratados con simvastatina 1 mg/Kg o vehículo (CMC 0.5%) una vez al día, por 20 días. Al día 80 post-infección, los ratones fueron sometidos a eutanasia y sus corazones fueron recolectados, para extraer ARN total y realizar análisis mediante RT-qPCR. **(A)** Modelo experimental *In vivo*. **(B)** Niveles de ARNm de ROCK-1 y ROCK-2. **(C)** Inmunohistoquímica de p-MYPT en tejido cardiaco. El gráfico muestra el porcentaje de marca DAB⁺ respecto al área total de cada campo. **(D)** Niveles de mRNA de citoquinas. **(E)** Correlación lineal entre los niveles de ARNm de ROCK y citoquinas. * $p < 0.05$ ** $p < 0.01$, analizado por el coeficiente de correlación de Pearson (r), ($n=15$ ratones).

DISCUSIÓN

La CCC es la manifestación más frecuente y severa de la Enfermedad de Chagas. Se ha llegado al consenso de que la persistencia del parásito en el tejido es crucial para el desarrollo de la CCC, por lo que los tratamientos antiparasitarios (Bz/NFX) deberían prevenir las complicaciones cardíacas en estos pacientes. Sin embargo, los resultados del estudio BENEFIT sugieren que el Bz, a pesar de disminuir la carga parasitaria, no produce ningún beneficio cardiovascular en pacientes con CCC [39].

En la búsqueda de nuevas estrategias terapéuticas, se han estudiado distintos posibles blancos farmacológicos para encontrar estrategias farmacológicas que faciliten la respuesta del hospedero a la infección y mejoren la respuesta a los antiparasitarios. ROCK-1 y ROCK-2 son serina/treonina quinasas involucradas en distintos procesos como proliferación, adhesión, migración y contracción celular [72], pero últimamente también se les ha atribuido un rol en procesos inflamatorios. En este trabajo se observó que la infección con *T. cruzi* rápidamente induce la activación de ROCK, y posteriormente aumenta su expresión en un cultivo de macrófagos. La actividad y expresión de ROCK se ha relacionado con diversas patologías cardiovasculares. Se ha observado que la expresión y actividad de ROCK está aumentada en leucocitos de ratas con hipertensión y que existe una correlación entre la actividad de ROCK en estos leucocitos y la hipertrofia y fibrosis cardíaca [112]. En humanos, la actividad de ROCK está incrementada en leucocitos de pacientes con hipertensión pulmonar, síndrome metabólico, síndrome coronario agudo, diabetes mellitus e insuficiencia cardíaca [113-116] e incluso se ha encontrado una relación inversa entre la activación de ROCK y la fracción de eyección en pacientes con insuficiencia cardíaca, por lo que se ha propuesto su detección como marcador para identificar pacientes de alto riesgo [115]. Todos estos antecedentes nos indican que la actividad de ROCK en leucocitos tiene una función en el desarrollo de enfermedades cardiovasculares que podría estar también ocurriendo en pacientes con CCC, y por lo tanto su modulación farmacológica podría prevenir y aminorar su sintomatología.

Esta es la primera vez que se estudia la activación y expresión de ROCK en macrófagos infectados con *T. cruzi*, por lo que este es un resultado novedoso. Incluso, el único trabajo publicado hasta ahora que ha relacionado la EC con ROCK fue realizado en fibroblastos dérmicos (HFF), donde Mott y cols. encontraron que la infección con *T. cruzi* produce disminución en la actividad de ROCK respecto al control a las 24, 48 y 72 horas de infección [117]. Este resultado es distinto al obtenido en esta tesis, y esto probablemente se debe a que son distintos tipos celulares, distintas cepas de *T. cruzi* y a las diferencias en el tiempo en el que se midió la actividad de la enzima ya que en el trabajo con fibroblastos se determinó la actividad a tiempos más largos cuando es posible que la actividad de ROCK ya vaya en descenso.

Al igual que en el cultivo de macrófagos U937, *T. cruzi* aumentó la activación y los niveles de ARNm de ROCK-1 en tejido cardíaco de ratones crónicamente infectados. El aumento en la expresión de ROCK en tejido cardíaco puede estar relacionado con la disminución en la función cardíaca observada en estos ratones, como consecuencia de la inflamación y fibrosis ocasionadas por el parásito [103]. El mismo aumento en la expresión de ROCK-1 se observó en condiciones no infecciosas, como en un modelo de isquemia-reperfusión [118]. Incluso, en un modelo murino se observó que la delección total de ROCK-1 previene la fibrosis cardíaca inducida por la sobrecarga de presión [119], lo que sugiere que ROCK-1 tiene un rol en el desarrollo de fibrosis cardíaca, la cual es una característica importante en la CCC. La relación entre la activación de ROCK determinada en este trabajo y el desarrollo de la CCC puede estar determinada por el rol de ROCK en la síntesis de citoquinas proinflamatorias, pero también con la función de ROCK en las distintas células que conforman el tejido cardíaco. Por ejemplo, la activación de ROCK induce la apoptosis e hipertrofia de cardiomiocitos [120], también la migración y proliferación de células de músculo liso vascular en modelos de hipertensión [121], la expresión de genes profibróticos en fibroblastos cardíacos [122] y la disminución de la síntesis de NO en células endoteliales [123]. Debido a que tanto la expresión como la activación de ROCK fue determinada en el corazón

completo, no es posible saber cuál de todas las células que conforman el tejido cardiaco presentan este aumento.

El mecanismo por el cual el parásito modula a ROCK en macrófagos es desconocido, sin embargo, puede relacionarse con diversas vías de señalización. Se ha reportado que LPS activa la vía RhoA/ROCK mediante la unión a TLR4 [124], un receptor también activado por *T. cruzi*. Los resultados de esta tesis demuestran que la activación de ROCK inducida por el parásito es mediada, en parte, por TLR4. Además de TLR4, el parásito también activa a TLR2, induciendo la expresión de citoquinas proinflamatorias [125]. Aunque en este trabajo no se pudo demostrar, es posible que TLR2 también esté involucrado en la activación de ROCK inducido por *T. cruzi*, ya que se ha observado que la activación de TLR2 con ácido lipoteicoico induce la activación de RhoA/ROCK en macrófagos humanos, gatillando la expresión de IL-23, parte del repertorio Th17 [88].

La activación de ROCK observada como consecuencia de la infección con *T. cruzi* ocurre a tiempos cortos, al igual que ocurre con la activación de NF- κ B [96], que es un factor de transcripción importante en la expresión de mediadores proinflamatorios. En nuestro modelo, la inhibición de ROCK impidió la fosforilación y localización nuclear de P65, marcador de activación de NF- κ B, de la misma manera que hizo el inhibidor de TLR4, TAK-242. Esto sugiere que la activación de TLR4 y de ROCK son procesos que ocurren río arriba de la activación de NF- κ B, lo que es consistente con otros reportes [126-128]. Se ha observado que ROCK-1 es capaz de fosforilar directamente a IKK β en la Ser-177 y Ser-181, produciendo la activación de NF- κ B [129], por lo que este podría ser el mecanismo de regulación en nuestro modelo.

Los procesos inflamatorios mediados por citoquinas son determinantes en la patogénesis y progresión de la CCC [130]. Los linfocitos y macrófagos de pacientes con CCC secretan mayores niveles de citoquinas proinflamatorias que los pacientes chagásicos crónicos asintomáticos [131], por lo que disminuir el ambiente proinflamatorio se posiciona como una estrategia farmacológica prometedora en la

CCC. Durante la fase aguda, la infección con *T. cruzi* gatilla una robusta respuesta proinflamatoria, importante para el control del parásito. Consecuentemente, nosotros observamos que la infección con *T. cruzi* aumentó la expresión y secreción de citoquinas proinflamatorias, coincidente con diversos estudios *in vitro*, en los que se ha identificado que la infección con *T. cruzi* aumenta los niveles de ARNm y proteína de IL-1 β , IL-6 y TNF- α e IFN- γ producidos por macrófagos a tiempos cortos de infección [132, 133]. Este efecto sobre la expresión de citoquinas proinflamatorias también se ha observado en modelos animales y en pacientes con CCC [45, 134, 135]. En paralelo a la producción de citoquinas proinflamatorias, *T. cruzi* induce la síntesis de citoquinas regulatorias como IL-10 e IL-4 para prevenir los efectos dañinos asociados a la estimulación excesiva del sistema inmune, los que además están involucrados en procesos de evasión de la respuesta inmune [136, 137]. En el presente trabajo se determinó la expresión de ARNm y niveles proteicos de 4 marcadores M2 (IL-10, IL-4, Arg-1, TGF- β), de los cuales 3 (IL-10, Arg-1 y TGF- β) aumentaron sus niveles ante la infección con *T. cruzi*, lo que se condice con hallazgos *in vitro* [138] y en pacientes con EC crónica [139].

Para estudiar el rol de ROCK en la síntesis de citoquinas, se utilizó el inhibidor Y-27632. Las constantes de inhibición (K_i) de Y-27632 con ROCK-1 y ROCK-2 son 0.22 y 0.3 μ M respectivamente, mientras que para otras quinasas como PKN, PKA, PKC y MLCK es 3.1, 25, 73 y >250 μ M respectivamente, lo que le confiere una alta especificidad [140]. Estas K_i fueron determinadas en ensayos de actividad enzimática *in vitro*, utilizando proteínas Myc-ROCK-1 y Myc-ROCK-2 recombinantes purificadas. Sin embargo, para estudios en cultivo celular, se demostró que Y-27632 10 μ M es capaz de inhibir el 100% de la actividad de ROCK [106], por lo que esa fue la concentración utilizada en esta tesis.

Últimamente, el número de estudios que muestran la capacidad de ROCK de modular el sistema inmune ha ido en aumento. En esta tesis, la inhibición de ROCK por Y-27632 produjo una disminución de la expresión y secreción de los marcadores M1, un aumento en el ARNm de la mayoría de los marcadores M2 (IL-10, Arg-1,

TGF- β), y una disminución de su liberación al medio de cultivo. Este efecto antiinflamatorio de la inhibición de ROCK se ha observado en diversos modelos tanto *in vitro* como *in vivo*. Por ejemplo, He y cols. encontraron que la inhibición de ROCK disminuye la inflamación en un modelo de artritis reumatoide, suprimiendo la síntesis de TNF- α e IL-1 β , pero no IL-10 [128]. Este mismo resultado se observó en PBMC inducidos con LPS [126] y en macrófagos de ratones administrados con LPS, en los que Y-27632 produjo una disminución en la expresión de TNF- α y un aumento de TGF- β , efecto acompañado de una mejora en el aclaramiento de células apoptóticas [141], y de un aumento en los marcadores M2 respecto a la infección.

Se ha observado en cultivos de macrófagos, que la activación de NF- κ B inducida por TLR-4 inhibe al Receptor Activado por el Proliferador de Peroxisomas Gamma (PPAR γ) [142]. El rol de PPAR γ en la polarización de macrófagos hacia M2 ha sido ampliamente estudiado en distintas líneas celulares [143]. En modelos murinos de CCC, se ha visto que los fármacos del grupo de las glitazonas, que son agonistas de PPAR γ , aumentan la expresión de Arg-1, y disminuyen la de TNF- α e IL-6 [144], reduciendo la inflamación y fibrosis cardiaca. Además, se ha observado, en células endoteliales y de músculo liso vascular, que pioglitazona y rosiglitazona inhiben la expresión y activación de ROCK. A su vez, el inhibidor de ROCK, Y-27632, induce la activación de PPAR γ , corroborando una regulación negativa entre ellos [145]. El aumento en los niveles de ARNm de IL-10 y Arg-1 producida por la inhibición de ROCK observada en este trabajo sugiere que ROCK regula de forma negativa a PPAR γ ; aunque no fue posible demostrar este hecho en este trabajo.

Al cuantificar la concentración de las citoquinas liberadas al medio de cultivo, se pudo observar que la inhibición de ROCK disminuyó la secreción tanto de los marcadores M1 como los M2. La secreción de citoquinas puede ocurrir mediante una “exocitosis regulada”, en la cual la señalización ligando-receptor gatilla la liberación de vesículas preformadas, o mediante una “exocitosis constitutiva” la cual es dependiente de la transcripción de las citoquinas en el núcleo [146]. Sin embargo, los macrófagos no contienen vesículas precargadas con citoquinas, por lo que, en

estas células, las citoquinas deben ser sintetizadas y liberadas por la vía constitutiva [147, 148]. La vía de tráfico de vesículas está implicada en variados procesos celulares como motilidad y polaridad celular, en los que distintas Rho GTPasas están involucradas. Así, la expresión de RhoA constitutivamente activa aumenta la secreción vesicular en mastocitos, y su inhibición por RhoGDI inhibe esta actividad [149, 150]; sin embargo, no se ha estudiado el rol de ROCK en el proceso de exocitosis de citoquinas en macrófagos. Los resultados de este trabajo sugieren que ROCK podría estar implicado en la secreción de citoquinas tanto M1 como M2, pues la inhibición de esta quinasa disminuyó los niveles extracelulares de citoquinas en ambos fenotipos, lo que es consistente con los estudios respecto a vías de secreción de citoquinas proinflamatorias (IL-6, TNF- α) y antiinflamatorias (IL-10), en las que se ha observado que tienen la misma vía de secreción [151]. No obstante, al analizar la relación entre citoquinas M1 y M2, se encontró que la inhibición de ROCK favorece una polarización M2.

Aunque Y-27632 no distingue entre isoformas de ROCK, impidiendo saber cuál de ellas es la implicada en la polarización de macrófagos, es posible sugerir que tanto ROCK-1 como ROCK-2 participan en la polarización inducida por *T. cruzi*, pues se ha observado que el silenciamiento específico de ROCK-1 y ROCK-2 previene la producción de IL-1 β en macrófagos [152].

En la actualidad existen fármacos inhibidores de ROCK aprobados para ser usados en pacientes. En oftalmología, la inhibición de ROCK regula la presión intraocular, mientras que ripasudil (aprobado en Japón) y netarsudil (aprobado en EE.UU.), ambos inhibidores de ROCK, se utilizan en el tratamiento del glaucoma [153]. Además, fasudil está aprobado en Japón y China, pero no por la FDA, para el tratamiento de vasoespasma cerebral. El uso de estos fármacos es aún acotado a ciertas enfermedades y en ciertos países, y aún falta tiempo para que su uso pueda ser aplicable a pacientes con EC. Es por esto, que es importante buscar un fármaco más ampliamente usado, con seguridad comprobada, que pueda inhibir a ROCK y proveer de una mejora en las características clínicas necesarias.

Las estatinas han sido estudiadas más allá de su rol como agentes hipolipemiantes. Estos fármacos inhiben la síntesis de isoprenoides importantes para la función de ROCK. Los resultados de este trabajo comprueban, por primera vez, que atorvastatina inhibe la vía ROCK inducida por *T. cruzi*. Esta acción de atorvastatina también se ha observado *in vivo* e *in vitro* en diversos modelos como la aterosclerosis [99, 154], hipertensión pulmonar [155] y administración de LPS en ratas [156]. El efecto antiinflamatorio de atorvastatina observado en esta tesis coincide mayormente con el del inhibidor de ROCK, Y-27632. Así, en presencia de *T. cruzi*, ambas moléculas disminuyeron los niveles de ARNm y secreción de citoquinas proinflamatorias. El uso de estatinas para la modulación de citoquinas es una estrategia previamente utilizada [157, 158], y su efecto antiinflamatorio en macrófagos ha sido investigado en diversas patologías, especialmente aterosclerosis, pero no en EC. Este efecto antiinflamatorio en macrófagos se puede explicar por su capacidad de inhibir la vía MyD88/NF- κ B, lo que reduce la expresión de mediadores proinflamatorios [159]. Además, la inhibición de NF- κ B inducida por estatinas está relacionada con una inducción en la autofagia vía Akt/mTORC1 [160, 161], lo que limita la activación del inflamasoma NLRP3, y, en consecuencia, la liberación de citoquinas proinflamatorias [162]. También, se ha propuesto que el efecto antiinflamatorio de las estatinas se debe a la supresión de la vía de señalización TRIF/IRF3/IFN- β [163], lo que reduce la fosforilación de STAT1, disminuyendo la expresión de genes proinflamatorios en macrófagos. Tanto MyD88 como TRIF son proteínas adaptadoras de TLRs, importantes en la respuesta inmune frente a *T. cruzi* [164]. TLR4 demostró estar río arriba de la activación de ROCK en nuestro modelo, y el efecto antiinflamatorio de atorvastatina se atenuó en los macrófagos que expresaron ROCK-1 y ROCK-2 CA, lo que comprueba el rol de ROCK-1 y ROCK-2 en el efecto de atorvastatina sobre la síntesis y liberación de citoquinas M1. Este efecto se debe a la importancia de ROCK en la activación del factor de transcripción NF- κ B, ya que la inhibición de la fosforilación de P65 inducida por atorvastatina no se observó en las células expresando ROCK-1 y ROCK-2 CA. Todo esto sugiere que, en la infección con *T. cruzi*, atorvastatina ejerce un efecto

antiinflamatorio inhibiendo la vía TLR4/MyD88/ROCK/NF- κ B en macrófagos, aunque el rol de MyD88 no fue evaluado.

Es interesante destacar que, de los marcadores M2, la atorvastatina sólo incrementó los niveles de ARNm de Arg-1 y TGF- β en los macrófagos infectados con *T. cruzi*, efecto que también fue prevenido por la expresión constitutiva de ROCK-1 y ROCK-2. Respecto a la secreción, no tuvo efecto sobre las citoquinas M2 *in vitro*, pero debido a su marcado efecto sobre las citoquinas proinflamatorias, la relación entre la secreción de citoquinas M1 y M2 sugiere favorecer el fenotipo M2. Es más, este mismo efecto se observó en modelos de macrófagos inducidos con LPS, donde simvastatina cambia el fenotipo de M1 a M2 [98]. Además, atorvastatina promueve una polarización M2 en monocitos humanos, a través de la activación de PPAR γ [100]. Es de resaltar que este aumento de la polarización M2 se relaciona con una prevención de la CCC [65, 66, 165]. Interesantemente, este efecto de la atorvastatina fue revertido por la expresión constitutiva de ROCK-1 y ROCK-2, demostrando la importancia de ambas isoformas de ROCK en el efecto antiinflamatorio de este fármaco. Si bien anteriormente se ha relacionado a ROCK con los efectos pleiotrópicos de las estatinas, esta es primera vez que se comprueba el importante rol de ROCK-1 y ROCK-2 en la modulación inflamatoria de este grupo farmacológico.

Al igual que atorvastatina, simvastatina ha demostrado inhibir la activación de la vía RhoA/ROCK [166]. De hecho, se han realizado estudios comparando la capacidad de inhibir ROCK de diversas estatinas [167], en los cuales se ha observado que tanto la lipofilia como la potencia de inhibición de HMG-CoA reductasa son factores determinantes en la capacidad de estas estatinas para inhibir ROCK en leucocitos [168]. En nuestro modelo murino de CCC, simvastatina disminuyó la expresión de ROCK-1 y ROCK-2 en tejido cardíaco, y la activación de ROCK. ROCK-1 demostró tener una relación lineal positiva con la expresión de citoquinas proinflamatorias, y una relación lineal negativa con la expresión de citoquinas antiinflamatorias, esto sugiere que ROCK podría también tener un rol en la inflamación *in vivo*. Este

resultado muestra el efecto de la estatina sobre el conjunto de células que conforman el tejido cardiaco, incluyendo cardiomiocitos, células endoteliales, fibroblastos, células de músculo liso vascular, y células del sistema inmune, incluyendo macrófagos, en los que se ha descrito que las estatinas tienen efectos antiinflamatorios [169, 170]. Anteriormente, describimos el efecto de estatinas en modelos murinos de CCC, donde observamos que simvastatina inhibe la activación de NF- κ B, inflamación, fibrosis y mejora la función cardiaca [96, 97, 103]. Estos efectos se producen, en parte, por la producción de 15-epi-lipoxina A4, un eicosanoide con efectos antiinflamatorios y pro-resolutorios de la inflamación inducido por estatinas y aspirina. Además, el año 2011, Melo y cols. demostraron que simvastatina disminuye la inflamación cardiaca en perros infectados con *T. cruzi*. Esta mejora fue acompañada por una disminución en la concentración sérica y ARNm en tejido cardiaco de TNF- α e IFN- γ , pero no de IL-10 [171]. Por otro lado, existe el efecto de las estatinas sobre la polarización de macrófagos, que induce cambios en otros tipos celulares. Se ha observado una correlación directa entre la infiltración de macrófagos M1 e hipertrofia cardiaca en ratones tratados con angiotensina II [172, 173], y que las citoquinas M1 activan miofibroblastos, inducen su proliferación y promueven el reclutamiento de fibrocitos, induciendo la fibrosis [174]. Por otro lado, los macrófagos M2 liberan TGF- β y galactina-3, lo que promueve la reparación tisular [175]. Esta evidencia indica que las citoquinas tienen un efecto sobre el daño en el tejido cardiaco producido en la CCC. Adicionalmente, ROCK participa en la retracción de los urópodos, lo que permite la migración transendotelial de monocitos *in vitro* [80], así como también en el reclutamiento y migración de macrófagos *in vivo* [176]. En ese sentido, el efecto de las estatinas sobre ROCK es consistente con la disminución de la infiltración de macrófagos observada en tejido cardiaco de pacientes y modelos animales con CCC tratados con estatinas.

La disfunción endotelial es uno de los mecanismos fisiopatológicos de la CCC. Los macrófagos y las CEs están directamente relacionados, y la secreción de mediadores de un tipo celular afecta al otro. Es por esto que quisimos estudiar el

efecto de la polarización de macrófagos sobre las CEs. Se ha determinado que los macrófagos M1 activan al endotelio, aumentando su adhesión [177, 178], pero no se ha estudiado el efecto que produce la activación de macrófagos sobre las CEs en la EC. En este trabajo, el medio condicionado de los macrófagos incubados con *T. cruzi*, polarizados hacia un fenotipo M1, aumentó la expresión de moléculas de adhesión celular (CAMs), y la secreción de citoquinas marcadoras de activación endotelial, junto con la adhesión de CEs a monocitos. De este modo, se comprueba que no es necesaria la interacción directa con el parásito para inducir cambios que puedan conllevar a complicaciones en la CCC. Se ha determinado que la expresión de citoquinas y quimioquinas como IL-1 β , TNF- α , IL-6 y del factor estimulador de colonias 1 (CSF-1) en las CEs conllevan a alteraciones en su función [179]. La IL-1 β , producida principalmente por macrófagos, altera las propiedades antitrombóticas de las CEs, reduciendo la producción del factor activador de plasminógeno, lo que conlleva a la formación de trombos [180]. A su vez, la IL-1 β induce la expresión de IL-6 en CEs y de factores estimuladores de granulocitos y macrófagos, como M-CSF y GM-CSF, lo que se puede ver reflejado en la alta población de monocitos en la microvasculatura, resultando en la secreción de citoquinas proinflamatorias [68]. Por lo tanto, el fenotipo de macrófagos inducido por *T. cruzi* tiene un rol importante en la activación endotelial observada en la EC, como se plantea en el modelo propuesto en la **Figura 28A**. Igualmente, la polarización hacia M2 inducida por atorvastatina mostró una disminución en la expresión de CAMs, adhesión a monocitos y secreción de citoquinas y quimioquinas relacionadas con activación endotelial en CEs. Las estatinas han demostrado mejorar directamente la función endotelial en células infectadas con *T. cruzi* [96], CEs estimuladas con citoquinas [181], así como también en otros modelos como hipercolesterolemia [182]. Sin embargo, este trabajo demostró que las estatinas no solo tienen un efecto directo sobre la inflamación y activación endotelial, sino que también la previenen indirectamente cambiando la polarización de los macrófagos (**Figura 28B**).

Distintas estatinas han sido probadas en estudios con pacientes con cardiomiopatías, debido a sus efectos pleiotrópicos. De estos estudios clínicos se ha obtenido distintos y contrapuestos resultados. Por ejemplo, en el estudio de Sola S y cols. se administró atorvastatina 20 mg/día o placebo a 108 pacientes con insuficiencia cardíaca (IC) no isquémica por 12 meses, y se observó que atorvastatina mejora la función cardíaca, y disminuye marcadores inflamatorios [183]. El mismo resultado obtuvo Node y cols, en un grupo de 63 pacientes con cardiomiopatía dilatada no isquémica, luego de 14 semanas de tratamiento con simvastatina 10 mg/día o placebo [184]. Por el contrario, el estudio GISSI-HF ingresó 7046 pacientes con IC crónica, a los cuales se les administró rosuvastatina 10 mg/día o placebo, durante aproximadamente 4 años. Este estudio concluyó que el tratamiento con la estatina no afectó los resultados clínicos de estos pacientes [185]. Además, el estudio CORONA asignó aleatoriamente a 5011 pacientes con IC isquémica el tratamiento con rosuvastatina 10 mg/día o placebo, y observó que rosuvastatina no disminuye el número de muertes, aunque sí el de hospitalizaciones cardiovasculares [186]. Es por esta divergencia de estudios que Gastelurrutia y cols, decidieron realizar un estudio prospectivo que incluyó 960 pacientes con IC con fracción de eyección ventricular izquierda (FEVI) preservada o reducida, los que fueron seguidos por 9 años. Este estudio observacional determinó que el tratamiento con estatinas se asocia con una menor mortalidad cardiovascular [187]. Los resultados contradictorios entre estos estudios pueden explicarse por la temporalidad de la terapia. Por esto se ha sugerido que, en las IC más leves, los eventos clínicos pueden modificarse con el tratamiento con estatinas, mientras que, en las IC avanzadas, la pérdida de la función del corazón no mejora con estos fármacos [187]. Al ser una enfermedad desatendida, no existen estudios clínicos que evalúen el efecto de las estatinas en pacientes con EC crónico. Es por esto por lo que el estudio clínico ATOCHA (ClinicalTrials.gov Identifier: NCT04984616, en etapa de reclutamiento de pacientes) busca evaluar la seguridad de atorvastatina en combinación con la terapia antichagásica, y su eficacia en reducir la inflamación, y mejorar la función endotelial y función cardíaca en comparación con la terapia antichagásica por sí sola, en pacientes con EC crónico, y CCC en etapa menor a II.

De este modo, el tratamiento con atorvastatina, en la fase crónica indeterminada, permitiría el remodelamiento inducido por la estatina en la CCC.

Cada vez hay más estudios que sugieren un papel fundamental de ROCK en la patogenia de las enfermedades cardiovasculares. Se sabe que ROCK media en un gran número de funciones celulares y fisiológicas, y que la activación de ROCK en los leucocitos humanos se correlaciona con diversas enfermedades cardiovasculares, por lo que podría usarse como un biomarcador clínico para el diagnóstico y seguimiento de estos trastornos. Este estudio introduce esta vía de señalización como un blanco importante para estudiar mecanismos patogénicos y nuevas estrategias farmacológicas en la EC. De este modo, el desafío a futuro es entender el rol de ROCK-1 y ROCK-2 en la infección con *T. cruzi*, en modelos agudos y crónicos, en animales y pacientes. Por lo tanto, la inhibición de ROCK mediante los nuevos inhibidores o reposicionando fármacos ampliamente usados, como las estatinas, podría ser un objetivo terapéutico novedoso y prometedor para atenuar o prevenir el daño cardíaco en la CCC.

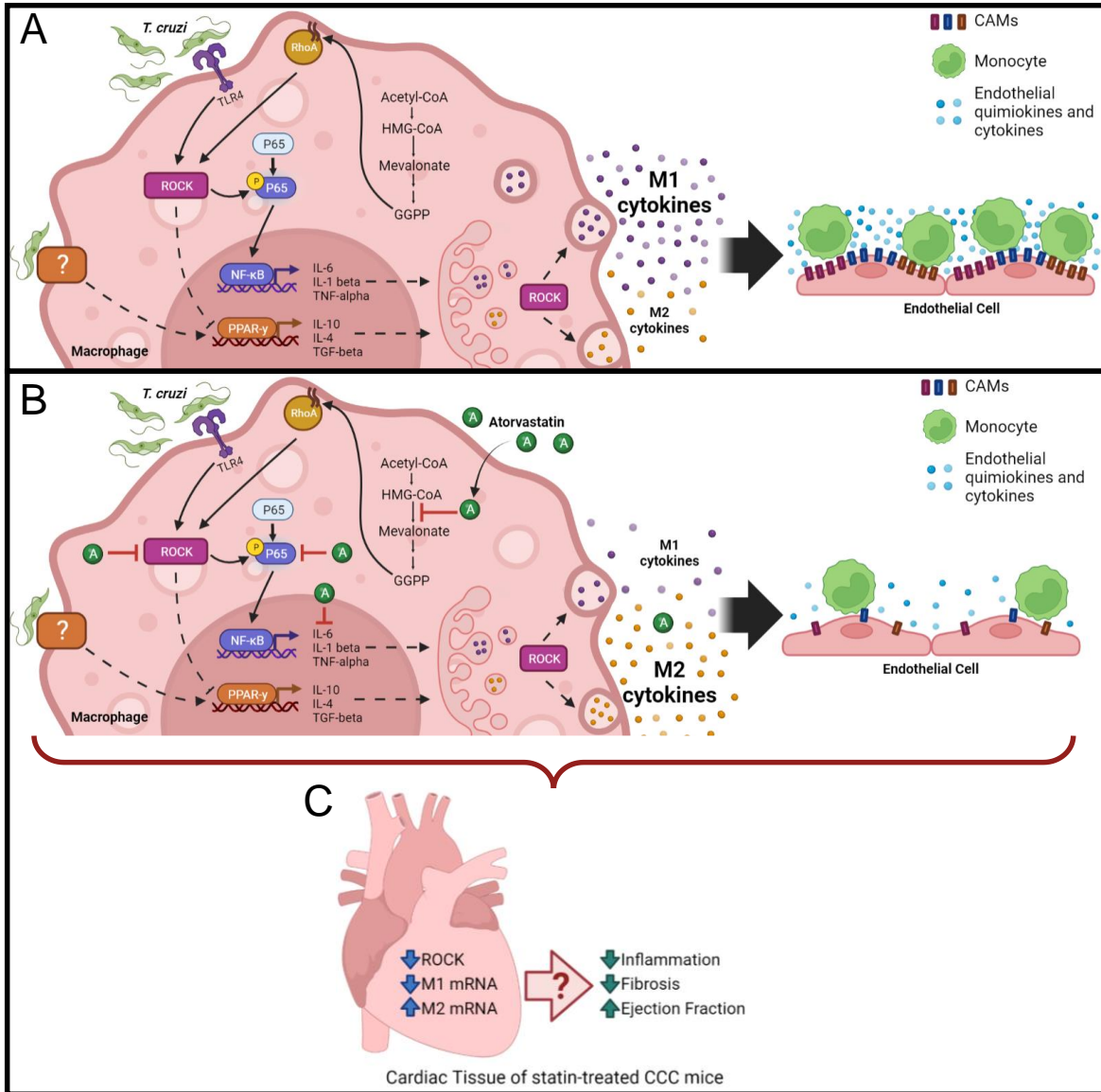


Figura 28. Resumen y modelo propuesto. (A) *T. cruzi*, mediante la activación de TLR4 activa a ROCK, el que induce la fosforilación y activación de NF-κB en macrófagos humanos. La activación de ROCK gatilla un fenotipo tipo M1, secretando citoquinas que inducen la activación y adhesión endotelial. **(B)** Atorvastatina inhibe la activación y expresión de ROCK, lo cual es clave para el efecto antiinflamatorio de la estatina. El cambio en el fenotipo hacia uno M2 reduce la activación y adhesión endotelial. **(C)** El tratamiento con simvastatina en ratones con CCC disminuye los niveles de mRNA de ROCK, y disminuye el balance proinflamatorio en tejido cardiaco, lo que se podría relacionar con la mejora en la inflamación, fibrosis y función cardiaca observado en estos animales.

CONCLUSIONES

A pesar de llevar más de cien años desde su descubrimiento, la EC sigue sin un tratamiento efectivo, especialmente para los pacientes con CCC. Debido a que la patogénesis de la CCC depende del perfil proinflamatorio inducido sistémicamente por la persistencia del parásito que conlleva a daño cardíaco, el uso de inmunomoduladores se ha convertido en un blanco racional para su tratamiento.

En este trabajo se ha demostrado por primera vez el rol de ROCK en la EC. En efecto, el *T. cruzi* activa la vía de ROCK en macrófagos a través del TLR4, además de inducir la expresión de ROCK-1. Los resultados de esta tesis sugieren que ROCK regula el perfil de citoquinas a 2 niveles: 1) niveles de ARNm, y 2) secreción. Se observó que ROCK regula de forma positiva activación de NF- κ B y la consecuente expresión de ARNm de los marcadores M1. Por otro lado, los resultados arrojaron un rol positivo de ROCK en la secreción de marcadores M1 y M2, lo que sugiere que ROCK participa en la exocitosis de estas citoquinas.

Tanto Y-27632 como atorvastatina disminuyeron la relación entre la secreción de citoquinas M1 y M2, indicando un cambio de fenotipo hacia M2. Además, se demostró que la inhibición de ROCK por atorvastatina es un paso crucial en la inhibición de NF- κ B y el cambio de fenotipo de macrófagos inducido por el fármaco. Este cambio en la polarización redujo la inflamación y adhesión de células endoteliales. Finalmente, se demostró que *in vivo* simvastatina disminuye la activación y expresión de ROCK-1 en tejido cardíaco de ratones con CCC, lo que se relaciona con el efecto antiinflamatorio del fármaco.

Estos resultados sugieren que, en efecto, la inhibición de ROCK por estatinas promueve la polarización tipo M2 en macrófagos infectados con *T. cruzi*, lo que reduce la activación de células endoteliales. Por consiguiente, el uso de inhibidores de ROCK, como las estatinas, podría ser una propuesta innovadora para prevenir el daño producido por citoquinas proinflamatorias en la CCC.

REFERENCIAS

1. Chagas, C., *Estudos sobre a morfologia e o ciclo evolutivo do Schizotrypanum cruzi n. gen., n. sp. agente etiológico da nova entidade mórbida do homem*. Mem Inst Oswaldo Cruz, 1909. **1**: p. 158-218.
2. Apt, W., Reyes H., *Aspectos epidemiológicos de la enfermedad de Chagas en Chile. I: Distribución geográfica, índices de infección en vectores y en humanos*. Parasitol. día, 1986. **10(3)**: p. 94-101.
3. Lorca H, M., et al., *Certificación serológica de la interrupción de la transmisión vectorial de la enfermedad de Chagas en Chile* %J Revista médica de Chile. 2001. **129**: p. 264-269.
4. Machado, F.S., et al., *Current understanding of immunity to Trypanosoma cruzi infection and pathogenesis of Chagas disease*. Semin Immunopathol, 2012. **34(6)**: p. 753-70.
5. *Chagas disease in Latin America: an epidemiological update based on 2010 estimates*. Wkly Epidemiol Rec, 2015. **90(6)**: p. 33-43.
6. Chile., M.G.d., *Norma general técnica. Control y prevención nacional de la enfermedad de Chagas*, D.d.E.d.E. Transmisibles, Editor. 2014.
7. WHO, *World Health Statistics*. 2014.
8. Gascon, J., C. Bern, and M.J. Pinazo, *Chagas disease in Spain, the United States and other non-endemic countries*. Acta Trop, 2010. **115(1-2)**: p. 22-7.
9. Bern, C., D.L. Martin, and R.H. Gilman, *Acute and congenital Chagas disease*. Adv Parasitol, 2011. **75**: p. 19-47.
10. Teixeira, D.E., et al., *Interactive multimedia to teach the life cycle of Trypanosoma cruzi, the causative agent of Chagas disease*. PLoS Negl Trop Dis, 2012. **6(8)**: p. e1749.
11. Rassi, A., Jr., A. Rassi, and J.A. Marin-Neto, *Chagas heart disease: pathophysiologic mechanisms, prognostic factors and risk stratification*. Mem Inst Oswaldo Cruz, 2009. **104 Suppl 1**: p. 152-8.
12. Coura, J.R., *Chagas disease: what is known and what is needed--a background article*. Mem Inst Oswaldo Cruz, 2007. **102 Suppl 1**: p. 113-22.
13. Lidani, K.C.F., et al., *The Complement System: A Prey of Trypanosoma cruzi*. Front Microbiol, 2017. **8**: p. 607.
14. Vago, A.R., et al., *Genetic characterization of Trypanosoma cruzi directly from tissues of patients with chronic Chagas disease: differential distribution of genetic types into diverse organs*. Am J Pathol, 2000. **156(5)**: p. 1805-9.
15. Munoz-San Martin, C., W. Apt, and I. Zulantay, *Real-time PCR strategy for the identification of Trypanosoma cruzi discrete typing units directly in chronically infected human blood*. Infect Genet Evol, 2017. **49**: p. 300-308.

16. Schijman, A.G., et al., *Early diagnosis of recurrence of Trypanosoma cruzi infection by polymerase chain reaction after heart transplantation of a chronic Chagas' heart disease patient.* J Heart Lung Transplant, 2000. **19**(11): p. 1114-7.
17. Organization, P.A.H., *Guidelines for the diagnosis and treatment of Chagas disease.* 2019: Washington, D.C.
18. Chile., M.G.d., *MANUAL DE PROCEDIMIENTO PARA LA ATENCIÓN DE PACIENTES CON ENFERMEDAD DE CHAGAS.* 2017.
19. Maya, J.D., et al., *Mode of action of natural and synthetic drugs against Trypanosoma cruzi and their interaction with the mammalian host.* Comp Biochem Physiol A Mol Integr Physiol, 2007. **146**(4): p. 601-20.
20. Apt, W., *Current and developing therapeutic agents in the treatment of Chagas disease.* Drug Des Devel Ther, 2010. **4**: p. 243-53.
21. Andrade, J.P., et al., *I Latin American Guidelines for the diagnosis and treatment of Chagas' heart disease: executive summary.* Arq Bras Cardiol, 2011. **96**(6): p. 434-42.
22. Molina, I., et al., *Randomized trial of posaconazole and benznidazole for chronic Chagas' disease.* N Engl J Med, 2014. **370**(20): p. 1899-908.
23. Morillo, C.A., et al., *Benznidazole and Posaconazole in Eliminating Parasites in Asymptomatic T. Cruzi Carriers: The STOP-CHAGAS Trial.* J Am Coll Cardiol, 2017. **69**(8): p. 939-947.
24. Prata, A., *Clinical and epidemiological aspects of Chagas disease.* Lancet Infect Dis, 2001. **1**(2): p. 92-100.
25. Hidron, A., et al., *Cardiac involvement with parasitic infections.* Clin Microbiol Rev, 2010. **23**(2): p. 324-49.
26. Bestetti, R.B., et al., *Prognosis of patients with chronic systolic heart failure: Chagas disease versus systemic arterial hypertension.* Int J Cardiol, 2013. **168**(3): p. 2990-1.
27. Pereira Nunes Mdo, C., et al., *Predictors of mortality in patients with dilated cardiomyopathy: relevance of chagas disease as an etiological factor.* Rev Esp Cardiol, 2010. **63**(7): p. 788-97.
28. Vilas Boas, L.G., et al., *Outcome of Chagas cardiomyopathy in comparison to ischemic cardiomyopathy.* Int J Cardiol, 2013. **167**(2): p. 486-90.
29. Rosenbaum, M.B. and A.J. Alvarez, *The electrocardiogram in chronic chagasic myocarditis.* Am Heart J, 1955. **50**(4): p. 492-527.
30. Viotti, R.J., et al., *Value of echocardiography for diagnosis and prognosis of chronic Chagas disease cardiomyopathy without heart failure.* Heart, 2004. **90**(6): p. 655-60.
31. Acquatella, H., *Echocardiography in Chagas heart disease.* Circulation, 2007. **115**(9): p. 1124-31.

32. Hasslocher-Moreno, A.M., et al., *Chagas disease mortality during the coronavirus disease 2019 pandemic: A Brazilian referral center experience*. Rev Soc Bras Med Trop, 2022. **55**: p. e0562.
33. Ribeiro, A.L., et al., *Diagnosis and management of Chagas disease and cardiomyopathy*. Nat Rev Cardiol, 2012. **9**(10): p. 576-89.
34. Milei, J., et al., *Myocardial inflammatory infiltrate in human chronic chagasic cardiomyopathy: Immunohistochemical findings*. Cardiovasc Pathol, 1996. **5**(4): p. 209-19.
35. Rossi, M.A., *Fibrosis and inflammatory cells in human chronic chagasic myocarditis: scanning electron microscopy and immunohistochemical observations*. Int J Cardiol, 1998. **66**(2): p. 183-94.
36. Reis, D.D., et al., *Characterization of inflammatory infiltrates in chronic chagasic myocardial lesions: presence of tumor necrosis factor-alpha+ cells and dominance of granzyme A+, CD8+ lymphocytes*. Am J Trop Med Hyg, 1993. **48**(5): p. 637-44.
37. Botoni, F.A., et al., *Treatment of Chagas cardiomyopathy*. Biomed Res Int, 2013. **2013**: p. 849504.
38. Bacal, F., et al., *Transplantation for Chagas' disease: an overview of immunosuppression and reactivation in the last two decades*. Clin Transplant, 2010. **24**(2): p. E29-34.
39. Morillo, C.A., et al., *Randomized Trial of Benznidazole for Chronic Chagas' Cardiomyopathy*. N Engl J Med, 2015. **373**(14): p. 1295-306.
40. Teixeira, A.R., et al., *Pathogenesis of chagas' disease: parasite persistence and autoimmunity*. Clin Microbiol Rev, 2011. **24**(3): p. 592-630.
41. Higuchi Mde, L., et al., *Correlation between Trypanosoma cruzi parasitism and myocardial inflammatory infiltrate in human chronic chagasic myocarditis: Light microscopy and immunohistochemical findings*. Cardiovasc Pathol, 1993. **2**(2): p. 101-6.
42. Bellotti, G., et al., *In vivo detection of Trypanosoma cruzi antigens in hearts of patients with chronic Chagas' heart disease*. Am Heart J, 1996. **131**(2): p. 301-7.
43. Zhang, L. and R.L. Tarleton, *Parasite persistence correlates with disease severity and localization in chronic Chagas' disease*. J Infect Dis, 1999. **180**(2): p. 480-6.
44. Garcia, S., et al., *Treatment with benznidazole during the chronic phase of experimental Chagas' disease decreases cardiac alterations*. Antimicrob Agents Chemother, 2005. **49**(4): p. 1521-8.
45. Teixeira, M.M., R.T. Gazzinelli, and J.S. Silva, *Chemokines, inflammation and Trypanosoma cruzi infection*. Trends Parasitol, 2002. **18**(6): p. 262-5.

46. Dutra, W.O. and K.J. Gollob, *Current concepts in immunoregulation and pathology of human Chagas disease*. *Curr Opin Infect Dis*, 2008. **21**(3): p. 287-92.
47. Dutra, W.O., et al., *Cellular and genetic mechanisms involved in the generation of protective and pathogenic immune responses in human Chagas disease*. *Mem Inst Oswaldo Cruz*, 2009. **104 Suppl 1**: p. 208-18.
48. Guedes, P.M., et al., *Deficient regulatory T cell activity and low frequency of IL-17-producing T cells correlate with the extent of cardiomyopathy in human Chagas' disease*. *PLoS Negl Trop Dis*, 2012. **6**(4): p. e1630.
49. Souza, P.E., et al., *Trypanosoma cruzi infection induces differential modulation of costimulatory molecules and cytokines by monocytes and T cells from patients with indeterminate and cardiac Chagas' disease*. *Infect Immun*, 2007. **75**(4): p. 1886-94.
50. Geissmann, F., et al., *Development of monocytes, macrophages, and dendritic cells*. *Science*, 2010. **327**(5966): p. 656-61.
51. Parisi, L., et al., *Macrophage Polarization in Chronic Inflammatory Diseases: Killers or Builders?* *J Immunol Res*, 2018. **2018**: p. 8917804.
52. Murray, P.J. and T.A. Wynn, *Protective and pathogenic functions of macrophage subsets*. *Nat Rev Immunol*, 2011. **11**(11): p. 723-37.
53. Benoit, M., B. Desnues, and J.L. Mege, *Macrophage polarization in bacterial infections*. *J Immunol*, 2008. **181**(6): p. 3733-9.
54. Mosser, D.M. and J.P. Edwards, *Exploring the full spectrum of macrophage activation*. *Nat Rev Immunol*, 2008. **8**(12): p. 958-69.
55. Martinez, F.O., et al., *Macrophage activation and polarization*. *Front Biosci*, 2008. **13**: p. 453-61.
56. Gordon, S., *Alternative activation of macrophages*. *Nat Rev Immunol*, 2003. **3**(1): p. 23-35.
57. Fraternali A, B.S., Magnani M., *Polarization and Repolarization of Macrophages*. *J Clin Cell Immunol*, 2015. **6**(2): p. 319.
58. Covarrubias, A., V. Byles, and T. Horng, *ROS sets the stage for macrophage differentiation*. *Cell Res*, 2013. **23**(8): p. 984-5.
59. Mantovani, A., et al., *Macrophage plasticity and polarization in tissue repair and remodelling*. *J Pathol*, 2013. **229**(2): p. 176-85.
60. Davis, M.J., et al., *Macrophage M1/M2 polarization dynamically adapts to changes in cytokine microenvironments in Cryptococcus neoformans infection*. *mBio*, 2013. **4**(3): p. e00264-13.
61. Yao, Y., X.H. Xu, and L. Jin, *Macrophage Polarization in Physiological and Pathological Pregnancy*. *Front Immunol*, 2019. **10**: p. 792.

62. Penas, F., et al., *Treatment in vitro with PPARalpha and PPARgamma ligands drives M1-to-M2 polarization of macrophages from T. cruzi-infected mice.* Biochim Biophys Acta, 2015. **1852**(5): p. 893-904.
63. Gomes, J.A., et al., *Evidence that development of severe cardiomyopathy in human Chagas' disease is due to a Th1-specific immune response.* Infect Immun, 2003. **71**(3): p. 1185-93.
64. Vitelli-Avelar, D.M., et al., *Strategy to assess the overall cytokine profile of circulating leukocytes and its association with distinct clinical forms of human Chagas disease.* Scand J Immunol, 2008. **68**(5): p. 516-25.
65. Wan, X., et al., *SIRT1-PGC1alpha-NFkappaB Pathway of Oxidative and Inflammatory Stress during Trypanosoma cruzi Infection: Benefits of SIRT1-Targeted Therapy in Improving Heart Function in Chagas Disease.* PLoS Pathog, 2016. **12**(10): p. e1005954.
66. Gupta, S. and N.J. Garg, *Prophylactic efficacy of TcVac2 against Trypanosoma cruzi in mice.* PLoS Negl Trop Dis, 2010. **4**(8): p. e797.
67. Rossi, M.A., et al., *Coronary microvascular disease in chronic Chagas cardiomyopathy including an overview on history, pathology, and other proposed pathogenic mechanisms.* PLoS Negl Trop Dis, 2010. **4**(8).
68. Tanowitz, H.B., et al., *Cytokine gene expression of endothelial cells infected with Trypanosoma cruzi.* J Infect Dis, 1992. **166**(3): p. 598-603.
69. Huang, H., et al., *Infection of endothelial cells with Trypanosoma cruzi activates NF-kappaB and induces vascular adhesion molecule expression.* Infect Immun, 1999. **67**(10): p. 5434-40.
70. Laucella, S., et al., *Soluble cell adhesion molecules in human Chagas' disease: association with disease severity and stage of infection.* Am J Trop Med Hyg, 1996. **55**(6): p. 629-34.
71. Riento, K. and A.J. Ridley, *Rocks: multifunctional kinases in cell behaviour.* Nat Rev Mol Cell Biol, 2003. **4**(6): p. 446-56.
72. Etienne-Manneville, S. and A. Hall, *Rho GTPases in cell biology.* Nature, 2002. **420**(6916): p. 629-35.
73. Sahai, E. and C.J. Marshall, *ROCK and Dia have opposing effects on adherens junctions downstream of Rho.* Nat Cell Biol, 2002. **4**(6): p. 408-15.
74. Nakagawa, O., et al., *ROCK-I and ROCK-II, two isoforms of Rho-associated coiled-coil forming protein serine/threonine kinase in mice.* FEBS Lett, 1996. **392**(2): p. 189-93.
75. Al-Humimat, G., et al., *Investigational Rho Kinase Inhibitors for the Treatment of Glaucoma.* J Exp Pharmacol, 2021. **13**: p. 197-212.
76. Qiao, Y.N., et al., *Myosin phosphatase target subunit 1 (MYPT1) regulates the contraction and relaxation of vascular smooth muscle and maintains blood pressure.* J Biol Chem, 2014. **289**(32): p. 22512-23.

77. Sanders, L.C., et al., *Inhibition of myosin light chain kinase by p21-activated kinase*. Science, 1999. **283**(5410): p. 2083-5.
78. Hartmann, S., A.J. Ridley, and S. Lutz, *The Function of Rho-Associated Kinases ROCK1 and ROCK2 in the Pathogenesis of Cardiovascular Disease*. Front Pharmacol, 2015. **6**: p. 276.
79. Saadeldin, I.M., et al., *Rocking the Boat: The Decisive Roles of Rho Kinases During Oocyte, Blastocyst, and Stem Cell Development*. Front Cell Dev Biol, 2020. **8**: p. 616762.
80. Honing, H., et al., *RhoA activation promotes transendothelial migration of monocytes via ROCK*. J Leukoc Biol, 2004. **75**(3): p. 523-8.
81. Zandi, S., et al., *ROCK-isoform-specific polarization of macrophages associated with age-related macular degeneration*. Cell Rep, 2015. **10**(7): p. 1173-86.
82. Liu, C., et al., *Targeting the shift from M1 to M2 macrophages in experimental autoimmune encephalomyelitis mice treated with fasudil*. PLoS One, 2013. **8**(2): p. e54841.
83. Rodrigues, M.M., A.C. Oliveira, and M. Bellio, *The Immune Response to Trypanosoma cruzi: Role of Toll-Like Receptors and Perspectives for Vaccine Development*. J Parasitol Res, 2012. **2012**: p. 507874.
84. Manarin, R., et al., *Benznidazole blocks NF-kappaB activation but not AP-1 through inhibition of IKK*. Mol Immunol, 2010. **47**(15): p. 2485-91.
85. Chow, J.C., et al., *Toll-like receptor-4 mediates lipopolysaccharide-induced signal transduction*. J Biol Chem, 1999. **274**(16): p. 10689-92.
86. Xie, X., et al., *Activation of RhoA/ROCK regulates NF-kappaB signaling pathway in experimental diabetic nephropathy*. Mol Cell Endocrinol, 2013. **369**(1-2): p. 86-97.
87. Liu, X., et al., *Geraniin Inhibits LPS-Induced THP-1 Macrophages Switching to M1 Phenotype via SOCS1/NF-kappaB Pathway*. Inflammation, 2016. **39**(4): p. 1421-33.
88. Park, S.Y., et al., *RhoA/ROCK-dependent pathway is required for TLR2-mediated IL-23 production in human synovial macrophages: suppression by cilostazol*. Biochem Pharmacol, 2013. **86**(9): p. 1320-7.
89. Wang, C., et al., *Inhibition of the Rho/Rho kinase pathway prevents lipopolysaccharide-induced hyperalgesia and the release of TNF-alpha and IL-1beta in the mouse spinal cord*. Sci Rep, 2015. **5**: p. 14553.
90. Gabrielli, L., et al., *Increased rho-kinase activity in hypertensive patients with left ventricular hypertrophy*. Am J Hypertens, 2014. **27**(6): p. 838-45.
91. Okamoto, R., et al., *FHL2 prevents cardiac hypertrophy in mice with cardiac-specific deletion of ROCK2*. FASEB J, 2013. **27**(4): p. 1439-49.

92. Doggrell, S.A., *Rho-kinase inhibitors show promise in pulmonary hypertension*. *Expert Opin Investig Drugs*, 2005. **14**(9): p. 1157-9.
93. Mera, C., et al., *Mechanisms of favorable effects of Rho kinase inhibition on myocardial remodeling and systolic function after experimental myocardial infarction in the rat*. *Ther Adv Cardiovasc Dis*, 2016. **10**(1): p. 4-20.
94. Goldstein, J.L. and M.S. Brown, *Regulation of the mevalonate pathway*. *Nature*, 1990. **343**(6257): p. 425-30.
95. Takemoto, M. and J.K. Liao, *Pleiotropic effects of 3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme a reductase inhibitors*. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 2001. **21**(11): p. 1712-9.
96. Campos-Estrada, C., et al., *Simvastatin and Benznidazole-Mediated Prevention of Trypanosoma cruzi-Induced Endothelial Activation: Role of 15-epi-lipoxin A4 in the Action of Simvastatin*. *PLoS Negl Trop Dis*, 2015. **9**(5): p. e0003770.
97. Gonzalez-Herrera, F., et al., *Simvastatin Attenuates Endothelial Activation through 15-Epi-Lipoxin A4 Production in Murine Chronic Chagas Cardiomyopathy*. *Antimicrob Agents Chemother*, 2017. **61**(3).
98. Li, Q.Z., et al., *[Anti-inflammation of simvastatin by polarization of murine macrophages from M1 phenotype to M2 phenotype]*. *Zhonghua Yi Xue Za Zhi*, 2013. **93**(26): p. 2071-4.
99. Nohria, A., et al., *Statins inhibit Rho kinase activity in patients with atherosclerosis*. *Atherosclerosis*, 2009. **205**(2): p. 517-21.
100. Zhang, O. and J. Zhang, *Atorvastatin promotes human monocyte differentiation toward alternative M2 macrophages through p38 mitogen-activated protein kinase-dependent peroxisome proliferator-activated receptor gamma activation*. *Int Immunopharmacol*, 2015. **26**(1): p. 58-64.
101. Naoumova, R.P., et al., *Prolonged inhibition of cholesterol synthesis explains the efficacy of atorvastatin*. *J Lipid Res*, 1997. **38**(7): p. 1496-500.
102. Corsini, A., F.M. Maggi, and A.L. Catapano, *Pharmacology of competitive inhibitors of HMG-CoA reductase*. *Pharmacol Res*, 1995. **31**(1): p. 9-27.
103. Guzman-Rivera, D., et al., *Simvastatin Improves Cardiac Function through Notch 1 Activation in BALB/c Mice with Chronic Chagas Cardiomyopathy*. *Antimicrob Agents Chemother*, 2020. **64**(8).
104. Yuen, S., O. Ogut, and F.V. Brozovich, *MYPT1 protein isoforms are differentially phosphorylated by protein kinase G*. *J Biol Chem*, 2011. **286**(43): p. 37274-9.
105. Grassie, M.E., et al., *Cross-talk between Rho-associated kinase and cyclic nucleotide-dependent kinase signaling pathways in the regulation of smooth muscle myosin light chain phosphatase*. *J Biol Chem*, 2012. **287**(43): p. 36356-69.

106. Ishizaki, T., et al., *Pharmacological properties of Y-27632, a specific inhibitor of rho-associated kinases*. Mol Pharmacol, 2000. **57**(5): p. 976-83.
107. Cerban, F.M., et al., *Signaling pathways that regulate Trypanosoma cruzi infection and immune response*. Biochim Biophys Acta Mol Basis Dis, 2020. **1866**(5): p. 165707.
108. Oliveira, A.C., et al., *Impaired innate immunity in Tlr4(-/-) mice but preserved CD8+ T cell responses against Trypanosoma cruzi in Tlr4-, Tlr2-, Tlr9- or Myd88-deficient mice*. PLoS Pathog, 2010. **6**(4): p. e1000870.
109. Demaison, C., et al., *High-level transduction and gene expression in hematopoietic repopulating cells using a human immunodeficiency [correction of imunodeficiency] virus type 1-based lentiviral vector containing an internal spleen focus forming virus promoter*. Hum Gene Ther, 2002. **13**(7): p. 803-13.
110. Garg, R., et al., *N-terminus-mediated dimerization of ROCK-I is required for RhoE binding and actin reorganization*. Biochem J, 2008. **411**(2): p. 407-14.
111. Haga, R.B., et al., *RhoBTB1 interacts with ROCKs and inhibits invasion*. Biochem J, 2019. **476**(17): p. 2499-2514.
112. Ocaranza, M.P., et al., *Rho kinase activation in circulating leukocytes is related to hypertensive myocardial remodeling*. Clin Sci (Lond), 2018. **132**(16): p. 1837-1853.
113. Liu, P.Y., et al., *Increased Rho kinase activity in a Taiwanese population with metabolic syndrome*. J Am Coll Cardiol, 2007. **49**(15): p. 1619-1624.
114. Do e, Z., et al., *Evidence for Rho-kinase activation in patients with pulmonary arterial hypertension*. Circ J, 2009. **73**(9): p. 1731-9.
115. Ocaranza, M.P., et al., *Markedly increased Rho-kinase activity in circulating leukocytes in patients with chronic heart failure*. Am Heart J, 2011. **161**(5): p. 931-7.
116. Dong, M., et al., *A combination of increased Rho kinase activity and N-terminal pro-B-type natriuretic peptide predicts worse cardiovascular outcome in patients with acute coronary syndrome*. Int J Cardiol, 2013. **167**(6): p. 2813-9.
117. Mott, A., et al., *Modulation of host cell mechanics by Trypanosoma cruzi*. J Cell Physiol, 2009. **218**(2): p. 315-22.
118. Min, F., et al., *Remote ischemic post-conditioning protects against myocardial ischemia/reperfusion injury by inhibiting the Rho-kinase signaling pathway*. Exp Ther Med, 2020. **19**(1): p. 99-106.
119. Zhang, Y.M., et al., *Targeted deletion of ROCK1 protects the heart against pressure overload by inhibiting reactive fibrosis*. FASEB J, 2006. **20**(7): p. 916-25.

120. Chang, J., et al., *Activation of Rho-associated coiled-coil protein kinase 1 (ROCK-1) by caspase-3 cleavage plays an essential role in cardiac myocyte apoptosis*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2006. **103**(39): p. 14495-500.
121. Shimizu, T., et al., *Crucial role of ROCK2 in vascular smooth muscle cells for hypoxia-induced pulmonary hypertension in mice*. Arterioscler Thromb Vasc Biol, 2013. **33**(12): p. 2780-91.
122. Zhou, H., et al., *Fasudil hydrochloride hydrate, a Rho-kinase inhibitor, suppresses high glucose-induced proliferation and collagen synthesis in rat cardiac fibroblasts*. Clin Exp Pharmacol Physiol, 2011. **38**(6): p. 387-94.
123. Ming, X.F., et al., *Rho GTPase/Rho kinase negatively regulates endothelial nitric oxide synthase phosphorylation through the inhibition of protein kinase B/Akt in human endothelial cells*. Mol Cell Biol, 2002. **22**(24): p. 8467-77.
124. Guo, F., et al., *GEF-H1/RhoA signalling pathway mediates lipopolysaccharide-induced intercellular adhesion molecular-1 expression in endothelial cells via activation of p38 and NF-kappaB*. Cytokine, 2012. **57**(3): p. 417-28.
125. Campos, M.A., et al., *Activation of Toll-like receptor-2 by glycosylphosphatidylinositol anchors from a protozoan parasite*. J Immunol, 2001. **167**(1): p. 416-23.
126. Segain, J.P., et al., *Rho kinase blockade prevents inflammation via nuclear factor kappa B inhibition: evidence in Crohn's disease and experimental colitis*. Gastroenterology, 2003. **124**(5): p. 1180-7.
127. Shimizu, S., et al., *Involvement of nuclear factor-kB activation through RhoA/Rho-kinase pathway in LPS-induced IL-8 production in human cervical stromal cells*. Mol Hum Reprod, 2007. **13**(3): p. 181-7.
128. He, Y., et al., *Antiinflammatory effect of Rho kinase blockade via inhibition of NF-kappaB activation in rheumatoid arthritis*. Arthritis Rheum, 2008. **58**(11): p. 3366-76.
129. Kim, H.J., et al., *IkappaB kinase gamma/nuclear factor-kappaB-essential modulator (IKKgamma/NEMO) facilitates RhoA GTPase activation, which, in turn, activates Rho-associated KINASE (ROCK) to phosphorylate IKKbeta in response to transforming growth factor (TGF)-beta1*. J Biol Chem, 2014. **289**(3): p. 1429-40.
130. Mocelin, A.O., et al., *The influence of aetiology on inflammatory and neurohumoral activation in patients with severe heart failure: a prospective study comparing Chagas' heart disease and idiopathic dilated cardiomyopathy*. Eur J Heart Fail, 2005. **7**(5): p. 869-73.
131. Peralisi, A.V., et al., *Fenofibrate Increases the Population of Non-Classical Monocytes in Asymptomatic Chagas Disease Patients and Modulates Inflammatory Cytokines in PBMC*. Front Cell Infect Microbiol, 2021. **11**: p. 785166.

132. de Pinho, R.T., et al., *Production of MMP-9 and inflammatory cytokines by Trypanosoma cruzi-infected macrophages*. Exp Parasitol, 2014. **147**: p. 72-80.
133. Cronemberger-Andrade, A., et al., *Trypanosoma cruzi-Infected Human Macrophages Shed Proinflammatory Extracellular Vesicles That Enhance Host-Cell Invasion via Toll-Like Receptor 2*. Front Cell Infect Microbiol, 2020. **10**: p. 99.
134. Silva, J.S., et al., *Tumor necrosis factor alpha mediates resistance to Trypanosoma cruzi infection in mice by inducing nitric oxide production in infected gamma interferon-activated macrophages*. Infect Immun, 1995. **63**(12): p. 4862-7.
135. Poveda, C., et al., *Cytokine profiling in Chagas disease: towards understanding the association with infecting Trypanosoma cruzi discrete typing units (a BENEFIT TRIAL sub-study)*. PLoS One, 2014. **9**(3): p. e91154.
136. Flavia Nardy, A., C.G. Freire-de-Lima, and A. Morrot, *Immune Evasion Strategies of Trypanosoma cruzi*. J Immunol Res, 2015. **2015**: p. 178947.
137. Waghabi, M.C., et al., *Transforming growth factor-ss as a therapeutic target for the cardiac damage of Chagas disease*. Mem Inst Oswaldo Cruz, 2022. **117**: p. e210395.
138. Wan, X., et al., *Origin of Monocytes/Macrophages Contributing to Chronic Inflammation in Chagas Disease: SIRT1 Inhibition of FAK-NFkappaB-Dependent Proliferation and Proinflammatory Activation of Macrophages*. Cells, 2019. **9**(1).
139. Dutra, W.O., et al., *Cytokine mRNA profile of peripheral blood mononuclear cells isolated from individuals with Trypanosoma cruzi chronic infection*. Scand J Immunol, 1997. **45**(1): p. 74-80.
140. Narumiya, S., T. Ishizaki, and M. Uehata, *Use and properties of ROCK-specific inhibitor Y-27632*. Methods Enzymol, 2000. **325**: p. 273-84.
141. Moon, C., et al., *N-acetylcysteine inhibits RhoA and promotes apoptotic cell clearance during intense lung inflammation*. Am J Respir Crit Care Med, 2010. **181**(4): p. 374-87.
142. Necela, B.M., W. Su, and E.A. Thompson, *Toll-like receptor 4 mediates cross-talk between peroxisome proliferator-activated receptor gamma and nuclear factor-kappaB in macrophages*. Immunology, 2008. **125**(3): p. 344-58.
143. Yao, Q., et al., *Peroxisome proliferator-activated receptor gamma (PPARgamma) induces the gene expression of integrin alphaVbeta5 to promote macrophage M2 polarization*. J Biol Chem, 2018. **293**(43): p. 16572-16582.
144. Penas, F.N., et al., *Treatment with a New Peroxisome Proliferator-Activated Receptor Gamma Agonist, Pyridinecarboxylic Acid Derivative, Increases*

- Angiogenesis and Reduces Inflammatory Mediators in the Heart of Trypanosoma cruzi-Infected Mice*. Front Immunol, 2017. **8**: p. 1738.
145. Gien, J., et al., *Peroxisome proliferator activated receptor-gamma-Rho-kinase interactions contribute to vascular remodeling after chronic intrauterine pulmonary hypertension*. Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol, 2014. **306**(3): p. L299-308.
 146. Stanley, A.C. and P. Lacy, *Pathways for cytokine secretion*. Physiology (Bethesda), 2010. **25**(4): p. 218-29.
 147. Shurety, W., et al., *Localization and post-Golgi trafficking of tumor necrosis factor-alpha in macrophages*. J Interferon Cytokine Res, 2000. **20**(4): p. 427-38.
 148. Manderson, A.P., et al., *Subcompartments of the macrophage recycling endosome direct the differential secretion of IL-6 and TNFalpha*. J Cell Biol, 2007. **178**(1): p. 57-69.
 149. Price, L.S., et al., *The small GTPases Rac and Rho as regulators of secretion in mast cells*. Curr Biol, 1995. **5**(1): p. 68-73.
 150. Mariot, P., et al., *Rho guanine nucleotide dissociation inhibitor protein (RhoGDI) inhibits exocytosis in mast cells*. EMBO J, 1996. **15**(23): p. 6476-82.
 151. Stanley, A.C., et al., *Recycling endosome-dependent and -independent mechanisms for IL-10 secretion in LPS-activated macrophages*. J Leukoc Biol, 2012. **92**(6): p. 1227-39.
 152. Kanno, S., et al., *The role of Rho-kinases in IL-1beta release through phagocytosis of fibrous particles in human monocytes*. Arch Toxicol, 2015. **89**(1): p. 73-85.
 153. Hoy, S.M., *Netarsudil Ophthalmic Solution 0.02%: First Global Approval*. Drugs, 2018. **78**(3): p. 389-396.
 154. Sawada, N. and J.K. Liao, *Rho/Rho-associated coiled-coil forming kinase pathway as therapeutic targets for statins in atherosclerosis*. Antioxid Redox Signal, 2014. **20**(8): p. 1251-67.
 155. Li, M., et al., *Inhibition of serotonin-induced mitogenesis, migration, and ERK MAPK nuclear translocation in vascular smooth muscle cells by atorvastatin*. Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol, 2007. **293**(2): p. L463-71.
 156. Zhang, H.S., et al., *Atorvastatin suppresses vascular hypersensitivity and remodeling induced by transient adventitial administration of lipopolysaccharide in rats*. Ann Transl Med, 2019. **7**(16): p. 386.
 157. Xu, H., et al., *RhoA-mediated, tumor necrosis factor alpha-induced activation of NF-kappaB in rheumatoid synoviocytes: inhibitory effect of simvastatin*. Arthritis Rheum, 2006. **54**(11): p. 3441-51.

158. McFarland, A.J., et al., *Differences in statin associated neuroprotection corresponds with either decreased production of IL-1beta or TNF-alpha in an in vitro model of neuroinflammation-induced neurodegeneration*. Toxicol Appl Pharmacol, 2018. **344**: p. 56-73.
159. Tuomisto, T.T., et al., *Simvastatin has an anti-inflammatory effect on macrophages via upregulation of an atheroprotective transcription factor, Kruppel-like factor 2*. Cardiovasc Res, 2008. **78**(1): p. 175-84.
160. Han, F., et al., *Atorvastatin ameliorates LPS-induced inflammatory response by autophagy via AKT/mTOR signaling pathway*. J Cell Biochem, 2018. **119**(2): p. 1604-1615.
161. Bruiners, N., et al., *The anti-tubercular activity of simvastatin is mediated by cholesterol-driven autophagy via the AMPK-mTORC1-TFEB axis*. J Lipid Res, 2020. **61**(12): p. 1617-1628.
162. Henriksbo, B.D., et al., *Fluvastatin causes NLRP3 inflammasome-mediated adipose insulin resistance*. Diabetes, 2014. **63**(11): p. 3742-7.
163. Abe, M., et al., *Effects of statins on adipose tissue inflammation: their inhibitory effect on MyD88-independent IRF3/IFN-beta pathway in macrophages*. Arterioscler Thromb Vasc Biol, 2008. **28**(5): p. 871-7.
164. Koga, R., et al., *TLR-dependent induction of IFN-beta mediates host defense against Trypanosoma cruzi*. J Immunol, 2006. **177**(10): p. 7059-66.
165. Gupta, S., et al., *Serum-mediated activation of macrophages reflects TcVac2 vaccine efficacy against Chagas disease*. Infect Immun, 2014. **82**(4): p. 1382-9.
166. Lampi, M.C., et al., *Simvastatin Ameliorates Matrix Stiffness-Mediated Endothelial Monolayer Disruption*. PLoS One, 2016. **11**(1): p. e0147033.
167. Liu, B., et al., *Effects of rosuvastatin versus atorvastatin on rho-associated coiled-coil containing protein kinase activity and endothelial function in patients with atherosclerosis*. J Int Med Res, 2011. **39**(6): p. 2314-22.
168. Rawlings, R., et al., *Comparison of effects of rosuvastatin (10 mg) versus atorvastatin (40 mg) on rho kinase activity in caucasian men with a previous atherosclerotic event*. Am J Cardiol, 2009. **103**(4): p. 437-41.
169. Hol, J., et al., *Statins affect the presentation of endothelial chemokines by targeting to multivesicular bodies*. PLoS One, 2012. **7**(7): p. e40673.
170. Koushki, K., et al., *Anti-inflammatory Action of Statins in Cardiovascular Disease: the Role of Inflammasome and Toll-Like Receptor Pathways*. Clin Rev Allergy Immunol, 2021. **60**(2): p. 175-199.
171. Melo, L., et al., *Low doses of simvastatin therapy ameliorate cardiac inflammatory remodeling in Trypanosoma cruzi-infected dogs*. Am J Trop Med Hyg, 2011. **84**(2): p. 325-31.

172. Heymans, S., et al., *Macrophage microRNA-155 promotes cardiac hypertrophy and failure*. *Circulation*, 2013. **128**(13): p. 1420-32.
173. Caglayan, E., et al., *Differential roles of cardiomyocyte and macrophage peroxisome proliferator-activated receptor gamma in cardiac fibrosis*. *Diabetes*, 2008. **57**(9): p. 2470-9.
174. Wynn, T.A. and L. Barron, *Macrophages: master regulators of inflammation and fibrosis*. *Semin Liver Dis*, 2010. **30**(3): p. 245-57.
175. Vernon, M.A., K.J. Mylonas, and J. Hughes, *Macrophages and renal fibrosis*. *Semin Nephrol*, 2010. **30**(3): p. 302-17.
176. Vemula, S., et al., *ROCK1 functions as a suppressor of inflammatory cell migration by regulating PTEN phosphorylation and stability*. *Blood*, 2010. **115**(9): p. 1785-96.
177. Jetten, N., et al., *Anti-inflammatory M2, but not pro-inflammatory M1 macrophages promote angiogenesis in vivo*. *Angiogenesis*, 2014. **17**(1): p. 109-18.
178. Zajac, E., et al., *Angiogenic capacity of M1- and M2-polarized macrophages is determined by the levels of TIMP-1 complexed with their secreted proMMP-9*. *Blood*, 2013. **122**(25): p. 4054-67.
179. Zhang, C., *The role of inflammatory cytokines in endothelial dysfunction*. *Basic Res Cardiol*, 2008. **103**(5): p. 398-406.
180. Bevilacqua, M.P., et al., *Interleukin 1 (IL-1) induces biosynthesis and cell surface expression of procoagulant activity in human vascular endothelial cells*. *J Exp Med*, 1984. **160**(2): p. 618-23.
181. Wagner, A.H., et al., *3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme A reductase-independent inhibition of CD40 expression by atorvastatin in human endothelial cells*. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 2002. **22**(11): p. 1784-9.
182. Rezaie-Majd, A., et al., *Simvastatin reduces the expression of adhesion molecules in circulating monocytes from hypercholesterolemic patients*. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 2003. **23**(3): p. 397-403.
183. Sola, S., et al., *Atorvastatin improves left ventricular systolic function and serum markers of inflammation in nonischemic heart failure*. *J Am Coll Cardiol*, 2006. **47**(2): p. 332-7.
184. Node, K., et al., *Short-term statin therapy improves cardiac function and symptoms in patients with idiopathic dilated cardiomyopathy*. *Circulation*, 2003. **108**(7): p. 839-43.
185. Tavazzi, L., et al., *Effect of rosuvastatin in patients with chronic heart failure (the GISSI-HF trial): a randomised, double-blind, placebo-controlled trial*. *Lancet*, 2008. **372**(9645): p. 1231-9.
186. Kjekshus, J., et al., *Rosuvastatin in older patients with systolic heart failure*. *N Engl J Med*, 2007. **357**(22): p. 2248-61.

187. Gastelurrutia, P., et al., *Statins in heart failure: the paradox between large randomized clinical trials and real life*. Mayo Clin Proc, 2012. **87**(6): p. 555-60.

PUBLICACIONES DERIVADAS DE LA TESIS

González-Herrera, F; Clayton, N; Guzmán-Rivera, D; Carrillo, I; Castillo, C; Anfossi, R; Catalán, M; Quintero-Pertuz, H; Quilaqueo, M.E.; Olea, C; Rivera-Meza, M; Kemmerling, U; Ridley, A; Vivar, R; Maya, J.D. Statins change the cytokine profile in *Trypanosoma cruzi*-infected U937 macrophages and murine cardiac tissue through Rho-associated kinases inhibition. *Frontiers in Immunology*. **ACEPTADO**.

OTRAS PUBLICACIONES EN PERIODO DE DOCTORADO

Campos-Estrada, C; Urarte, E; Denegri, M; Villalón, L; **González-Herrera, F**; Kemmerling, U; Maya, J.D. Effect of statins on inflammation and cardiac function in patients with chronic Chagas disease: A protocol for pathophysiological studies in a multicenter, placebo-controlled, proof-of-concept phase II trial. *Plos One*. **EN PRENSA**.

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. Trypanocidal effect of alcoholic extract of *Castanedia santamartensis* (Asteraceae) leaves is based on altered mitochondrial function. *Biomed Pharmacother*. 2022 Apr;148:112761. doi: 10.1016/j.biopha.2022.112761. Epub 2022 Feb 28. PMID: 35240521.

Carrillo I, Rabelo RAN, Barbosa C, Rates M, Fuentes-Retamal S, **González-Herrera F**, Guzmán-Rivera D, Quintero H, Kemmerling U, Castillo C, Machado FS, Díaz-Araya G, Maya JD. Aspirin-triggered resolvin D1 reduces parasitic cardiac load by decreasing inflammation in a murine model of early chronic Chagas disease. *PLoS Negl Trop Dis*. 2021 Nov 16;15(11):e0009978. doi: 10.1371/journal.pntd.0009978. PMID: 34784372; PMCID: PMC8631674.

Guzmán-Rivera D, Liempi A, **González-Herrera F**, Fuentes-Retamal S, Carrillo I, Abarca P, Castillo C, Kemmerling U, Pesce B, Maya JD. Simvastatin Improves Cardiac Function through Notch 1 Activation in BALB/c Mice with Chronic Chagas

Cardiomyopathy. *Antimicrob Agents Chemother.* 2020 Jul 22;64(8):e02141-19. doi: 10.1128/AAC.02141-19. PMID: 32393497; PMCID: PMC7526820.

Campos-Estrada C, **González-Herrera F**, Greif G, Carillo I, Guzmán-Rivera D, Liempi A, Robello C, Kemmerling U, Castillo C, Maya JD. Notch receptor expression in *Trypanosoma cruzi*-infected human umbilical vein endothelial cells treated with benznidazole or simvastatin revealed by microarray analysis. *Cell Biol Int.* 2020 May;44(5):1112-1123. doi: 10.1002/cbin.11308. Epub 2020 Jan 22. PMID: 31943572.

PRESENTACIONES EN CONGRESOS INTERNACIONALES

González-Herrera, F.; Clayton, N; Carrillo, I; Guzmán-Rivera, D; Castillo, C; Catalán, M; Quilaqueo, ME; Rivera-Meza, M; Ridley, A; Vivar, R; Maya, JD. Atorvastatin decreases pro-inflammatory cytokine secretion of *T. cruzi*-infected macrophages through rho kinase inhibition, which impedes endothelial cell activation. 15th International Congress of Parasitology. August 21-26, 2022, Copenhagen, Denmark.

González-Herrera F, Ridley A, Vivar R, Maya JD. Rol de ROCK en el efecto antiinflamatorio de atorvastatina en macrófagos infectados con *T. cruzi*. VIII Curso Internacional de Biología Molecular de Tripanosomátidos. VIII Simposio Internacional de Biología Molecular de la Enfermedad de Chagas. 22-26 de Noviembre de 2021. *On line*. Presentación oral.

González-Herrera F.; Guzman-Rivera D.; Carrillo I.; Lapier M.; Ridley A. J.; Vivar R.; Maya J. D. Effect of atorvastatin on the Rho-kinase pathway and the polarization of human macrophages infected with *Trypanosoma cruzi*. World Microbe Forum. June 20-24, 2021, *On line*.

Gonzalez-Herrera F., Guzman-Rivera D., Castillo C., Lapier M., Vivar R., Maya J.D. Effect of atorvastatin on the rho-kinase (ROCK) pathway and the polarization of human macrophages infected with *Trypanosoma cruzi* (*T. cruzi*). 16th International Conference on Innate Immunity. June 7-12, 2019, Rhodes, Greece.

González-Herrera, F; Guzmán-Rivera, Daniela; Carrillo, I; Liempi, A; Fuentes-Retamal S; Pesce, B; Castillo, C; Kemmerling, U; Maya, JD. Simvastatin induces Notch 1 activation in *Trypanosoma cruzi* endothelial infection. Bristol ENDOTHELIAL meeting. September 19, 2019, Bristol, United Kingdom.

PRESENTACIONES EN CONGRESOS NACIONALES

González-Herrera, F.; Clayton, N; Carrillo, I; Guzmán-Rivera, D; Castillo, C; Catalán, M; Quilaqueo, ME; Rivera-Meza, M; Ridley, A; Vivar, R; Maya, JD. Role of rho kinase (ROCK) on the antiinflammatory effect of atorvastatin on *Trypanosoma cruzi*-infected macrophages. XLIII Congreso Anual de la Sociedad de Farmacología. 05-09 diciembre, 2022, Punta Arenas, Chile.

González-Herrera F, Clayton N, Carrillo I, Guzmán-Rivera D, Castillo C, Catalán M, Quilaqueo ME, Rivera-Meza M, Ridley A, Vivar R, Maya JD. Atorvastatin decreases pro-inflammatory cytokine expression in *T. cruzi*-infected macrophages through Rho Kinase inhibition. Simposio “Estudiantes de Doctorado”. XLII Congreso Anual de la Sociedad de Farmacología de Chile. 1-3 de diciembre de 2021. *On line*. Presentación oral.

González-Herrera, F.; Cerutti, C.; Clayton, N.; Guzmán-Rivera, D.; Vivar, R.; Ridley, A.; Maya, J.D. Rol de ROCK-1 Y ROCK-2 en la adhesión y migración de macrófagos activados por *Trypanosoma cruzi* y tratados con atorvastatina. XLI Congreso Anual de la Sociedad de Farmacología de Chile. 04-08 noviembre, 2019, Concepción, Chile.

González-Herrera, F; Guzmán-Rivera, D; Alfaro, S; Vivar, R; Maya, JD. Effect of atorvastatin on the activation of the Rho-kinase (ROCK) pathway and the polarization of human *T. cruzi*-infected macrophages. XL Congreso Anual de la Sociedad de Farmacología de Chile. 13-16 noviembre, 2018, Santa Cruz, Chile.

González-Herrera, F; Guzmán-Rivera, D; Castillo, C; Campos-Estrada, C; Liempi, A; Greif, G; Robello, C; Kemmerling, U; Maya-Arango, JD. Modulación farmacológica de la infección endotelial con *Trypanosoma cruzi*: Análisis transcriptómico. XXXIX Congreso Anual de la Sociedad de Farmacología de Chile. 22-25 de noviembre de 2017, Puerto Varas, Chile.

BECAS Y PREMIOS EN PERIODO DE DOCTORADO

Primer Lugar Modalidad Póster, otorgado por la Sociedad de Farmacología de Chile (SOFARCHI) en el XLII Congreso Anual de Farmacología de Chile. 04-09, diciembre, 2022. Punta Arenas, Chile.

Beca de Arancel, otorgada por la Facultad de Ciencias Químicas y Farmacéuticas. Año 2022.

Beca Pasantía en el Extranjero, otorgada por la Agencia Nacional de Investigación y Desarrollo (ANID). 01 de abril al 30 de noviembre, 2019. Universidad de Bristol, Bristol, Reino Unido.

Beca Gastos Operacionales, otorgada por la Agencia Nacional de Investigación y Desarrollo (ANID). Años 2019 y 2020.

Beca de Asistencia a Congreso, otorgada por la Facultad de Ciencias Químicas y Farmacéuticas. Año 2018.

Beca Doctorado Nacional, otorgada por la Agencia Nacional de Investigación y Desarrollo (ANID). Años 2017 al 2020.