

UNIVERSIDAD DE CHILE
FACULTAD DE CIENCIAS QUIMICAS Y FARMACEUTICAS



**EFFECTO DE SIMVASTATINA Y BENZNIDAZOL SOBRE LA
EXPRESIÓN DE MOLÉCULAS DE ADHESIÓN Y ACTIVACIÓN DE
NFκB EN CÉLULAS ENDOTELIALES HUMANAS INFECTADAS
CON *Trypanosoma cruzi*.**

Tesis presentada a la Universidad de Chile
para optar al Grado de Doctor en Farmacología
CAROLINA ANDREA CAMPOS ESTRADA

Director de Tesis

DR. JUAN DIEGO MAYA

Co-Director de Tesis

DR. RODRIGO LOPEZ MUÑOZ

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

SANTIAGO- CHILE

2015

Se informa a la Dirección de Postgrado de la Facultad de Ciencias Químicas y Farmacéuticas que la Tesis presentada por el candidato:

Carolina Campos Estrada

Ha sido aprobada por la Comisión Informante de Tesis como requisito para optar al Grado de Doctor en Farmacología, en el examen de defensa de Tesis rendido el día 15 de Junio de 2015.

Directores de Tesis:

Dr. Juan Diego Maya

Dr. Rodrigo López Muñoz

Comisión Informante:

Dr. Guillermo Díaz (Presidente)

Dr. Hernan Lara

Dr. Arturo Ferreira

Dr. Ramón Rodrigo

Dra Lysette Leyton

*A Sergio, por su paciencia, amor infinito
y por ser la fuerza en cada momento de cansancio.*

*A Ema, Miguel y Cristian
por la compañía y apoyo incondicional.*

En estos cuatro años he conocido muchas personas a las que agradecer, aquellas que sólo su saludo cariñoso era suficiente para comenzar el día, y aquellas que participaron activamente de este trabajo.

Al Dr. Juan Diego Maya por la confianza depositada, por abrir las puertas de su laboratorio que fue un universo de aprendizaje. Gracias por el apoyo, compromiso, dedicación y principalmente por la calidad humana de la que fui testigo en estos años.

Al Dr. Rodrigo López por su generosidad al enseñarme su conocimiento y guiarme en aquellos detalles que muchas veces nos encierran sin ver salida. Quizás sin saberlo nos enseñaste a todos la valentía para tomar decisiones y emprender nuevos desafíos.

Al Dr. Jorge Ferreira porque siempre tenía una palabra de aliento cuando algo no salía bien y me motivaba a seguir adelante. Agradezco ese humor cotidiano que hacían agradables muchos momentos del día. Gracias por abrir las puertas de su casa y compartir momentos inolvidables en la vida de un estudiante.

A la Dra. Ulrike Kemmerling por su cercanía, confianza y apoyo durante todo este proceso. Compartimos conversaciones enriquecedoras tanto intelectualmente como personalmente que no olvidaré.

A la distinguida comisión evaluadora de esta tesis que se comprometió con mi trabajo, fueron una excelente guía y apoyo. Agradezco las críticas y los innumerables aportes al desarrollo y engranaje de la tesis.

Al profesor Mario Pavani y Sra Mary por su empatía, preocupación y apoyo incondicional con todos los estudiantes del laboratorio. A Enrique Moraga, Juan Rivas, Jorge Muñoz y Jorge Leiva por el apoyo técnico, que fue fundamental en la realización de esta tesis y de todos los trabajos que se realizan en el laboratorio.

La convivencia diaria en un laboratorio es un capítulo completo, pasamos juntos muchas horas al día y en algunos casos de lunes a domingo. Por tanto, los compañeros de laboratorio se transforman, de alguna manera, en la familia con quienes reímos, lloramos, discutimos, cantamos, bailamos y lo más importante nos apoyamos cuando nos agotamos. Es por esto que quiero agradecer a Michel, María Victoria, Liliana, Felix, Anita, Christian, Daniel, Roberto, Alejandra, Fabiola, Fabián, Andrea, Alfredo, Francisco, Miguel, Cristian, José, Mabel, Daniela, Jeanette, Leo, José M, Lorena, Sebastián y a todos los que pasaron por el laboratorio.

Agradecer a mi familia, que son el motor de todo lo que emprendo y son los que han construido las bases sobre las que me impulso. Gracias por estar siempre pendientes, preocupados y queriéndome en cada paso de la vida.

Finalmente a Ser por ser el refugio perfecto a todas mis emociones, por vivir conmigo cada pasaje de estos cuatro años. Fue difícil estar lejos, pero gracias a tu esfuerzo incansable de estar a mi lado en todos los momentos, jamás me sentí sola.

Al final del viaje comienza un camino, otro buen camino que seguir descalzados contando la arena...quedamos los que puedan sonreír.

INDICE GENERAL DE CONTENIDOS**PÁGINA**

INDICE DE TABLAS.	iv
INDICE DE FIGURAS.	iv
RESUMEN.	vi
ABSTRACT.	vii
I. ANTECEDENTES	1
Epidemiología.	1
Ciclo biológico de <i>t. Cruzi</i> .	2
Manifestaciones de la enfermedad de chagas.	3
Patogénesis de la enfermedad.	4
Patogénesis de la cardiopatía chagásica.	5
Daño microvascular.	6
Disfunción endotelial en el daño microvascular.	7
Rol de la señalización de NFκB en la disfunción endotelial.	8
Rol de las moléculas de adhesión celular en la disfunción endotelial.	9
Tratamiento farmacológico en la enfermedad de chagas.	10
II. HIPÓTESIS.	16

III. OBJETIVOS.	17
Objetivo general.	17
Objetivos espeíficos.	17
<hr/>	
IV. MATERIALES Y MÉTODOS.	18
Lineas celulares.	18
Obtención de parásitos.	19
Ensayo de viabilidad celular.	19
Expresión de ECAMs por citometría de flujo.	20
Expresión de ECAMs por inmunofluorescencia indirecta.	21
Expresión de ECAMs por Western Blot.	21
Determinación de amastigotes intracelular.	23
Ensayo de integridad de citoesqueleto.	23
Ensayo de adhesión celular.	24
Determinación de 15-epi-lipoxina A ₄ .	25
Localización de p65 por microsopia confocal.	27
Análisis estadístico.	28
<hr/>	
V. RESULTADOS	29
Expresión de ECAMs en la infección con <i>T. cruzi</i> .	29
Efecto de simvastatina o benznidazol sobre la expresión de ECAMs en células endoteliales humanas infectadas con <i>T. cruzi</i> .	32

Efecto de simvastatina o benznidazol sobre la carga de amastigotes intracelular.	35
Efecto de simvastatina o benznidazol sobre la adhesión celular en células endoteliales humanas infectadas con <i>T. cruzi</i> .	39
Efecto de simvastatina o benznidazol sobre la señalización de NFκB en un modelo de activación endotelial con <i>T. cruzi</i> .	41
Determinación de 15-epi-lipoxina a ₄ e inhibición de 5-lox en células endoteliales humanas infectadas con <i>T. cruzi</i> .	44
Efecto de 15-epi-lipoxina- A ₄ sobre la señalización NFκB en un modelo activación endotelial con <i>T. cruzi</i> .	47
<hr/>	
VI. DISCUSIÓN	50
<hr/>	
VII. CONCLUSIÓN	56
<hr/>	
VIII. REFERENCIAS	57
<hr/>	
IX. ANEXOS	65

INDICE DE TABLAS	PÁGINA
Tabla 1. Datos MS y cuantificación de cada condición experimental por DSA-TOF MS AxION 2 TOF MS.	46
Tabla 2. Simvastatina y benznidazol no alteran la viabilidad celular a las concentraciones en las que se enmarca la evaluación de la expresión de moléculas de adhesión.	65

INDICE DE FIGURAS	PÁGINA
Figura 1. Ciclo Biológico de <i>Trypanosoma cruzi</i> .	2
Figura 2. Ruta biosintética de 15-epi-lipoxinas.	13
Figura 3. Espectro de masa representativo del estándar de 15-epi-LXA ₄ .	26
Figura 4. <i>Trypanosoma cruzi</i> aumenta la expresión de ECAMs en en células EA.hy926 y HUVEC.	30
Figura 5. Simvastatina o benznidazol disminuyen la expresión de ECAMs sobre la superficie de células endoteliales durante la infección con <i>Trypanosoma cruzi</i> .	33
Figure 6. Simvastatina o benznidazol disminuyen la expresión total de ECAMs durante la infección con <i>Trypanosoma cruzi</i> .	36
Figure 7. El tratamiento con simvastatina o benznidazol previo a la infección con <i>T. cruzi</i> no afecta la carga de amastigotes intracelular.	37

Figura 8. Simvastatina o benznidazol disminuyen la carga de amastigotes intracelulares postinfección.	38
Figure 9. Simvastatina y benznidazol disminuyen la adhesión celular durante la infección con <i>Trypanosoma cruzi</i> .	40
Figura 10. Simvastatina y benznidazol bloquean la activación de NFκB durante la infección de células EA.hy926 con <i>Trypanosoma cruzi</i> .	42
Figura 11. 15-epi-lipoxina-A ₄ es inducida por simvastatina y al inhibir su producción el efecto de simvastatina se revierte, aumentando la expresión de ECAMs en células endoteliales infectadas con <i>Trypanosoma cruzi</i> .	45
Figura 12. 15-epi-lipoxina A ₄ previene el aumento de expresión de ECAMs sobre la superficie de células endoteliales durante la infección con <i>Trypanosoma cruzi</i> y bloquea la activación de NFκB.	48
Figura 13. Simvastatina y benznidazol previenen la activación endotelial en la infección con <i>Trypanosoma cruzi</i> , a través de la disminución de expresión de ECAMs y la disminución de la adhesión celular.	56
Figura suplementaria 1. Efecto de simvastatina sobre la viabilidad de células EAhy926 y tripomastigotes Dm28c.	65
Figura Suplementaria 2. Efecto de simvastatina sobre la organización del citoesqueleto.	66
Figura suplementaria 3. Efecto de simvastatina o benznidazol sobre la expresión de ECAMs a concentraciones crecientes en células EA.hy926 infectadas con <i>T. cruzi</i> .	67

RESUMEN

La enfermedad de Chagas es causada por *Trypanosoma cruzi*. Este parásito desencadena una respuesta inflamatoria que tiende a controlar la infección en el hospedero. Sin embargo, la permanencia del parásito provoca la persistencia de la inflamación que finalmente conduce al desarrollo de la Cardiopatía Chagásica Crónica (CCC). La CCC es consecuencia de alteraciones microvasculares, entre otros mecanismos. Característicamente, la expresión de moléculas de adhesión celular (ECAMs) como ICAM-1, VCAM, y E-selectina, está aumentada para favorecer el reclutamiento de células inflamatorias. Es posible mejorar el tratamiento antichagásico actual modificando algunos aspectos de la fisiopatología en el hospedero. Así, se propone que simvastatina, por sus efectos pleiotrópicos que modulan la respuesta inflamatoria vascular, podría mejorar la disfunción endotelial inducida por *T. cruzi*. Este efecto estaría mediado por un mecanismo que involucra la producción de un eicosanoide proresolutorio de la inflamación denominado 15-epi-lipoxina A₄, que deriva de la ruta sintética de 5-lipoxigenasa, o también conocido como lipoxinas gatilladas por aspirina.

Se realizó un modelo de activación endotelial, en el que células endoteliales EA.hy926 y HUVEC fueron previamente tratadas con simvastatina 5 µM o benznidazol 20 µM durante 24 horas, y posteriormente infectadas con *T. cruzi* por 16 horas. Se observó que ambos fármacos fueron capaces de prevenir el aumento de la expresión de ECAMs y en consecuencia, disminuyeron la adhesión celular sin afectar la viabilidad celular ni la integridad del citoesqueleto. Además, este efecto es independiente de su actividad tripanocida. Por otra parte, ambos fármacos bloquearon la activación de la cascada de NF-κB y el traslado de p65 al núcleo, pero sólo simvastatina indujo la producción de 15-epi-lipoxina A₄. Es más, la 15-epi-lipoxina A₄ fue capaz de disminuir, por sí misma, la expresión de ECAMs.

Se concluye que simvastatina o benznidazol previenen la activación endotelial, aunque sólo simvastatina actúa a través de un mecanismo dependiente de la producción de este lípido pro-resolutorio de la inflamación, 15-epi-lipoxina A₄. Como la inflamación y la disfunción endotelial tienen un rol pivotal en la patogénesis de la enfermedad de Chagas, es posible que simvastatina y benznidazol puedan modular el daño microvascular de la enfermedad de Chagas. Por lo tanto, en este trabajo presentamos las bases que soportan el uso de simvastatina en el tratamiento de la Cardiopatía Chagásica.

SUMMARY

Chagas disease is caused by *Trypanosoma cruzi*. This parasite triggers an inflammatory response to control host's infection. As the inflammatory response persists, the patients develop Chronic Chagas Cardiomyopathy (CCC). The CCC is consequence of microvascular alterations, among others mechanisms. This process is characterized by an increased expression of Endothelial Cell Adhesion Molecules (ECAMs) like ICAM-1, VCAM, and E-selectin, allowing inflammatory cell recruitment. It is possible to improve the current treatment modifying some aspects of the pathophysiology in the host. Thus, it is proposed that simvastatin may improve vascular immune response due to their pleiotropic effects in the modulating inflammatory responses and improve endothelial dysfunction induced by *T. cruzi*. This effect would be mediated by a mechanism that involves the production of a novel pro-resolving lipid, the 5-lipoxygenase derivative 15-epi-lipoxin A₄, which belongs to aspirin triggered lipoxins.

A model of endothelial activation was performed in which EA.hy926 and HUVEC endothelial cells were pretreated with 5 μM simvastatin or 20 μM benznidazole for 24 hours, and then infected with *T. cruzi* parasite for 16 hours. It was observed that both drugs prevented the increase in ECAMs and in consequence, decreases cell adhesion without affecting the cell viability and cytoskeleton. Thus, the effect is independent of their trypanocidal activity. Furthermore, both drugs blocked NF-κB activation and they blocked the transfer of the nucleus p65, and in the case of simvastatin, this effect was mediated by the production of 15-epi-lipoxin A₄. In the other hand, the 15-epi-lipoxin A₄ was able to decrease by itself, the expression of ECAMs.

In conclusion, both drugs prevent the *T. cruzi*-induced endothelial activation but only simvastatin acts through a mechanism dependent on the production of this pro-resolving lipid, 15-epi-lipoxin A₄. As the inflammation and endothelial dysfunction have a key role in the pathogenesis of Chagas disease, simvastatin and benznidazole may modulate the microvascular damage in Chagas disease. Thus, we provide the bases that support the future use of simvastatin in the treatment of cardiac Chagas disease.

I. ANTECEDENTES

La enfermedad de Chagas, también conocida como Tripanosomiasis Americana, es una infección sistémica causada por el protozoo flagelado *Trypanosoma cruzi*. Fue descrita por primera vez por el médico brasileño Carlos Chagas en el año 1909. Es transmitida al ser humano y a más de 150 especies de animales domésticos y mamíferos, a través de insectos vectores perteneciente a la subfamilia de los triatomíneos, que se conoce en Chile como “vinchuca”, pero también puede ser transmitida por transfusiones de sangre, trasplantes o verticalmente de madre a hijo. Sin embargo, el riesgo de transmisión por estas vías es más bajo que el vectorial [1]

EPIDEMIOLOGÍA

La Organización Mundial de la Salud ha estimado que en todo el mundo, existen 10 millones de personas expuestas a *T. cruzi*, concentradas principalmente en América Latina, donde la enfermedad es endémica. Se calcula que más de 25 millones de personas están en riesgo de contraer la enfermedad de Chagas, y en el año 2008 murieron más de 10.000 personas por esta causa [2]. La incidencia de esta enfermedad ha disminuido en los últimos 20 años debido a la erradicación del insecto vector. Sin embargo, aún es un problema de salud pública, puesto que la migración desde zonas rurales hacia las urbanizadas y desde países endémicos ha aumentado el número de nuevos casos de Chagas en E.E.U.U., Canadá y Europa [3-5]. Se estima que en E.E.U.U. existen 300.000 de personas expuestas a *T. cruzi*, incluso el impacto de la enfermedad de Chagas se ha asemejado con las primeras décadas de la epidemia de VIH/SIDA [6].

CICLO BIOLÓGICO DE *T. cruzi*

El ciclo de vida de *T. cruzi* es complejo, ya que tiene varias etapas de desarrollo, tanto en el mamífero hospedero como en el insecto vector. Se han descrito 4 formas que adopta el parásito para sobrevivir y adaptarse a las condiciones ambientales, que se describen en la figura 1.

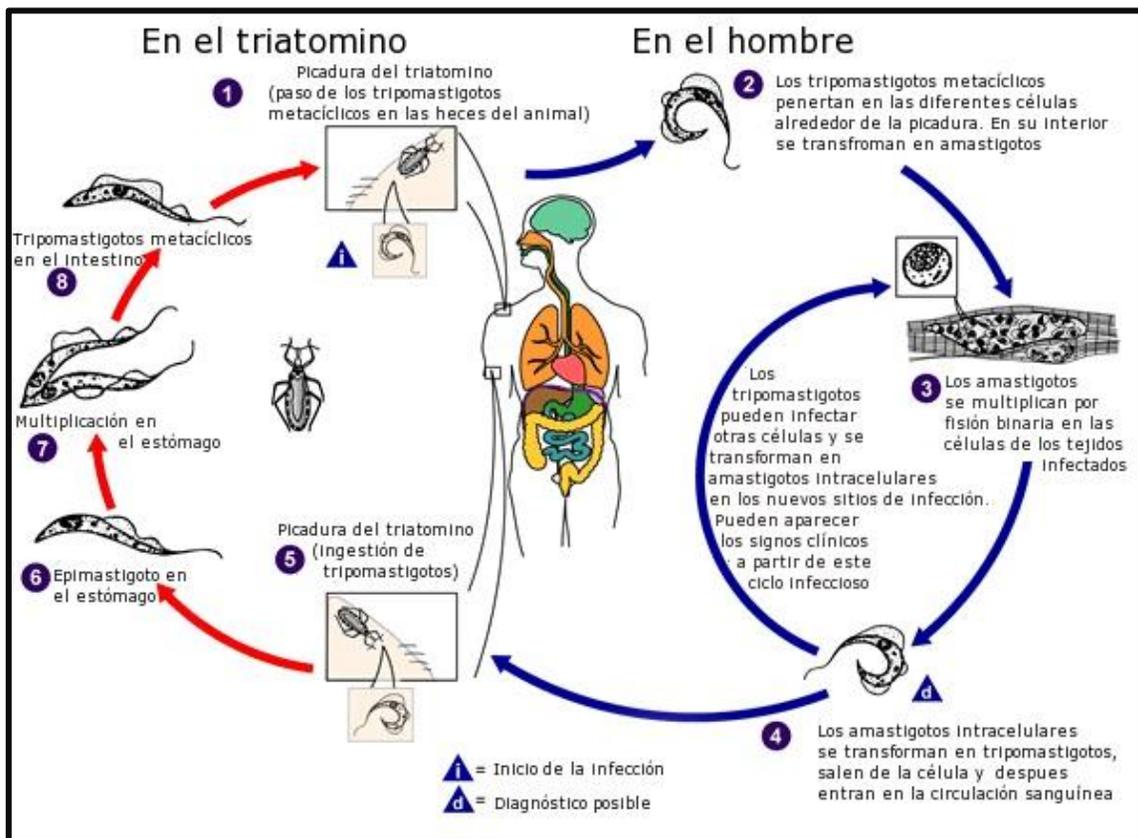


Figura 1. Ciclo biológico de *Trypanosoma cruzi* en el hospedero y en el insecto vector (adaptado de CDC: <http://www.dpd.cdc.gov/dpdx>).

MANIFESTACIONES CLÍNICAS DE LA ENFERMEDAD DE CHAGAS

La enfermedad de Chagas se presenta en dos fases: aguda y crónica, a su vez la fase crónica se subdivide en fase determinada e indeterminada. La fase aguda puede ser asintomática o presentar síntomas inespecíficos como estados febriles, escalofríos, mialgias, erupción cutánea y taquicardia. También puede presentarse una lesión inflamatoria en la zona de entrada del parásito denominada chagoma, edema periorbitario unilateral (Signo de Romaña), conjuntivitis, entre otros [7]. Estos síntomas pueden durar de 4-8 semanas, mientras que la fase crónica puede durar toda la vida. La muerte en la fase aguda ocurre en un 5-10% de los casos sintomáticos, como resultado de una miocarditis severa y meningoencefalitis [1].

En la fase crónica, se presenta la forma indeterminada o latente que se caracteriza por no presentar manifestaciones pero con serología positiva, y el 30% de los individuos infectados la desarrolla, cursa con ausencia de parásitos en sangre pero involucra manifestaciones graves tales como megaesófago, megacolon y cardiopatía, que pueden ser letales [1,7].

Durante la infección aguda existe un aumento de parásitos en sangre que en contacto con las células del sistema inmune desencadenan una respuesta inflamatoria, con el fin de controlar la replicación del parásito. Si esta respuesta inflamatoria persiste por un tiempo prolongado, se da paso a la fase crónica de la enfermedad, en la cual hay ausencia de parásitos en sangre, pero estos ya han invadido órganos y tejidos [8,9].

PATOGÉNESIS DE LA ENFERMEDAD DE CHAGAS

Respuesta en el hospedero

Los mecanismos específicos asociados a la etiopatogenia de la enfermedad son multifactoriales e involucran tanto al parásito, como al hospedero. Así, estudios en modelos experimentales de infección por *T. cruzi* sugieren que un mecanismo patogénico importante se desencadena a partir de la respuesta inmunológica innata. Esta respuesta ocurre una vez que el parásito infecta células nucleadas, como macrófagos. Estas células liberan interleukina 12 (IL-12) que favorece la liberación de interferón γ (INF- γ) desde las células *Natural Killer* (NK). Además, INF γ asociado al factor de necrosis tumoral α (TNF- α), induce la expresión de la enzima óxido nítrico sintasa inducible, lo que favorece la liberación de óxido nítrico (NO \cdot), que al reaccionar con peróxido de hidrogeno, genera peroxinitrito (ONOO \cdot), anión altamente tóxico para el parásito [10-12].

Por otro lado, este mecanismo de defensa puede ser perjudicial para el hospedero, pues si persiste la inflamación inducida por el parásito, la enfermedad puede evolucionar hacia la fase crónica. En todo caso, el parásito encuentra la forma de evadir al sistema inmune, induciendo mecanismos inmunosupresores mediados por el factor de crecimiento β (TGF- β). TGF- β inhibe la secreción y actividad de IFN- γ e inhibe la expresión de la iNOS, disminuyendo la capacidad tripanocida de los macrófagos y generando un ambiente favorable para su replicación intracelular y posterior diseminación por el organismo. Durante este mismo proceso, TNF- α , proveniente de macrófagos activados, induce apoptosis en linfocitos T. La fagocitosis de estos cuerpos apoptóticos junto con los parásitos fomenta la producción de TGF- β y también de prostaglandinas, lo que potencia la inhibición de la iNOS y aumenta la producción de poliaminas en el macrófago. Estas

poliaminas son necesarias para que el parasito sintetice tripanotión, principal tiol antioxidante en tripanosomátidos y por tanto, se ve favorecida la proliferación del parásito [13]

La persistencia del parásito en el hospedero, favorecida por una respuesta inmune tipo 2 (T_H-2), genera un estado inflamatorio de baja intensidad [12]. De esta manera, a lo largo de muchos años, se produce daño estructural en diversos órganos llevando a aparición de las manifestaciones características de la fase crónica sintomática.

Patogénesis de la cardiopatía chagásica

La cardiomiopatía chagásica crónica (CCC) es la forma más grave de la enfermedad y la que se presenta en el 90% de los pacientes que presentan sintomatología durante esta fase [14]. La CCC cursa con arritmias complejas, falla cardiaca, tromboembolismo y muerte súbita. Los mecanismos fisiopatológicos aún no se han descrito completamente. Sin embargo, evidencia en animales y seres humanos sugieren 4 mecanismos involucrados: La disautonomía cardiaca, alteraciones microvasculares, daño miocárdico dependiente del parásito, y lesión miocárdica mediada por la respuesta inmune [16].

En ratones BALB/c infectados con *T. cruzi* se ha observado el desarrollo de una cardiopatía similar a la de humanos, con cardiomegalia macroscópica, con dilatación de los ventrículos y aneurismas apicales del ventrículo izquierdo. A nivel microscópico se observaron focos de necrosis miocitolítica, infiltrado linfomononuclear asociado a fibrosis intersticial y pseudoquistes ocasionales [16], lo que indica un daño inflamatorio severo. Este daño puede ser atribuible a cualquiera de los mecanismos mencionados. Sin embargo, en los vasos epicárdicos e intracárdicos pequeños se han detectado agregados

plaquetarios formando trombos oclusivos, debido a la liberación de sustancias vasoconstrictoras, tales como tromboxano A₂ (TXA₂) y factor activador de plaquetas (PAF) [16,17]. Estos eventos resultan en la mionecrosis, miocitolisis y vasculitis observadas en la CCC, demostrando la participación del daño microvascular [7,15].

Daño microvascular

El resultado de la constante inflamación, isquemia y necrosis en el tejido cardiaco es un proceso de remodelamiento miocárdico que conduce al adelgazamiento de la pared y posterior formación de aneurismas apicales. Además se presenta miocitolisis y mionecrosis, resultado de la lisis de células infectadas, tras la diferenciación de amastigotes en tripomastigotes sanguíneos y su posterior salida al torrente sanguíneo. La necrosis a su vez, es el resultado de vasoespasmos locales en la microvasculatura coronaria que producen un daño de hipoperfusión, seguido de reperfusión. Por su parte, el remodelamiento cardiaco implica cambios estructurales asociados al reemplazo de cardiomiocitos por tejido fibroso, y la acumulación de colágeno extracelular alrededor de estas fibras, engrosando la membrana basal. Estos cambios son irreversibles y conducen a las alteraciones estructurales y funcionales del corazón. [7].

En la última década se ha estudiado con gran interés, la participación de la vasculatura en la CCC, ya que los tripomastigotes para acceder al tejido cardiaco deben atravesar la monocapa endotelial, las células musculares lisas vasculares y áreas intersticiales de la vasculatura. Por tanto, dado que la vasculatura comprende el 34% del miocardio es razonable especular que la interacción del parásito y el endotelio es importante en la

patogenia de la infección [18]. Además existe evidencia de presencia de amastigotes en las células endoteliales de la microvasculatura coronaria antes que la parasitemias sea detectada, lo que sugiere que el endotelio coronario podría ser un blanco inicial de la infección [19].

Disfunción endotelial en el daño microvascular

El endotelio juega un rol importante en la inflamación, ya que regula el tono vascular, la hemostasia y la permeabilidad de macromoléculas y leucocitos. El proceso en el cual el endotelio comienza a participar en la inflamación es denominado “activación endotelial”, y se caracteriza por un aumento de la expresión de moléculas de adhesión celular (CAMs) y tono vascular, a través de la liberación de endotelina-1 (ET-1). Además, el endotelio activado promueve la agregación plaquetaria y la coagulación a través de la liberación de TXA₂ y factor de Von Willebrand [20]. La disfunción endotelial característica en la infección con *T. cruzi* se evidencia microscópicamente a través de inflamación y puntos de discontinuidad citoplasmáticas (que corresponderían a la exposición de colágeno subendotelial), asociado a agregados plaquetarios y fibrina, lo que podría afectar la generación de sustancias vasoactivas [18]. Estudios *in vivo* e *in vitro*, indican que la infección del endotelio resulta en la expresión de citocinas pro-inflamatorias y CAMs. Además, la infección de células endoteliales (ECs) activa al factor nuclear κB (NFκB) contribuyendo a la inducción de la expresión de citocinas y moléculas de adhesión en el endotelio [21].

Rol de la señalización de NFκB en la disfunción endotelial.

La primoinfección de macrófagos, con su posterior activación, se inicia con la unión de glicoproteínas de la superficie del parásito al receptor Toll-like Receptor 4 (TLR4), presente en macrófagos. Esta interacción gatilla una cascada de señalización intracelular, que involucra la fosforilación de las kinasas activadas por mitógenos (MAPK), y la activación del factor nuclear potenciador de las cadenas ligeras kappa de las células B activadas (NFκB) [24].

El complejo NFκB es un factor de transcripción y está formado por 5 subunidades que dimerizan dependiendo del gen que van a controlar. En las células endoteliales, el heterodímero p50/p65 une a κB a la secuencia consenso del gen de las CAMs para activar su transcripción [23]. En estado inactivo, NFκB está formando un dímero que le impide trasladarse al núcleo, ya que es retenido en el citoplasma por la familia de inhibidores de NFκB (IκB) [24]. Ante un estímulo proinflamatorio, IκB puede ser fosforilado por el complejo IκB kinasa (IKK). La fosforilación de IκB es una señal de ubiquitinización, por lo que IκB es degradada en el proteosoma [25, 26]. De esta manera, la subunidad p50/p65 de NFκB queda libre y es trasladada al núcleo, para aumentar la expresión de quimioquinas, CAMs y citocinas involucradas en la respuesta inflamatoria. Para la activación de NFκB, es necesaria la fosforilación del complejo IKK. IKK es fosforilada por diversas kinasas como MAP/ERK kinasa kinasa 1 (MEKK1) o por autofosforilación [26].

Se ha reportado que en la infección de macrófagos con *T. cruzi*, existe una liberación de citocinas pro-inflamatorias inducidas por la activación de NFκB, que facilitan la invasión

del parásito a otros tipos celulares [27]. Además se ha demostrado que la expresión de E-CAMs, citokinas e iNOS es regulado a través de la activación de NFκB [28].

Rol de las moléculas de adhesión celular en la disfunción endotelial.

Cuando el endotelio es activado, a través de NFκB, aumenta la expresión de CAMs, ya que los mecanismos de defensa del hospedero, tales como el reclutamiento y activación de las células inflamatorias dependen de procesos de comunicación célula-célula, expresadas en la superficie del endotelio vascular. Estas CAMs incluyen a la molécula de adhesión intracelular-1 (ICAM-1), molécula de adhesión celular vascular 1 (VCAM-1) y la selectina endotelial (E-selectina), entre otras. Algunas de estas se pueden encontrar en forma soluble, ya que luego del clivaje proteolítico o por *splicing* alternativo pueden ser liberadas al torrente sanguíneo [29]. Las E-CAMs afectan la permeabilidad a macromoléculas, expresión de proteínas de superficie y reclutamiento de leucocitos, y por tanto pueden ser medidas como marcadores de activación endotelial. Por otra parte, existe evidencia que la expresión de E-CAMs aumenta durante la infección por *T. cruzi* y se correlacionan con la severidad y etapa de la enfermedad chagásica, regulando el reclutamiento de células inflamatorias, cuya persistencia determina la evolución de la cardiomiopatía chagásica [30].

Por lo tanto, el estudio de la activación endotelial, a través de la expresión de moléculas de adhesión vía NFκB, es un blanco de interés para el tratamiento de la disfunción endotelial en la cardiopatía chagásica.

Tratamiento farmacológico de la enfermedad de chagas

El tratamiento farmacológico se basa en el uso de benznidazol o nifurtimox, ambos fármacos son prodrogas, ya que son activados por una nitroreductasa I (NTR-I) dependiente de NADPH. Esta actividad enzimática implica la reducción de dos electrones del grupo nitro, generando un derivado de hidroxilamina. Esta reacción es oxígeno-insensible, es decir no genera especies reactivas de oxígeno sino metabolitos altamente tóxicos para el parásito. El metabolito más importante del benznidazol es el 4,5 dihidroximidazol. La ruptura de este metabolito libera dialdehído-glioxal, que en presencia de guanosina, genera aductos de guanosina-glioxal que alteran la estabilidad del ADN y por tanto la viabilidad del parásito [31,32]. Aparentemente, este mecanismo es clave en la actividad tripanocida del fármaco. Estos fármacos han demostrado ser efectivos en un 80% en la fase aguda y en un 20% en fase crónica, reduciendo la severidad de los síntomas y disminuyendo la agresividad de la enfermedad [33,34]. Sin embargo, no curan el 100% de los casos, presentan graves efectos laterales, algunas cepas son resistentes, son de alto costo y poco accesibles para los pacientes [34].

Actualmente, en muchos países se utiliza como primera línea terapéutica benznidazol, ya que ha demostrado ser mejor en disminuir la carga parasitaria *in vitro*, *in vivo* y en pacientes crónicos [34]. Además, benznidazol ha mostrado menor incidencia de efectos adversos y menor costo económico. En Chile se comercializa nifurtimox, pero este fármaco ya está en retirada y recientemente se ha incorporado benznidazol al arsenal terapéutico.

Lamentablemente, ambas drogas producen daño al hospedero tales como: cefalea, dermatitis, prurito, fiebre, parestesias, neuropatías periféricas y convulsiones, que

provocan el abandono de la terapia [34]. Por tanto, es necesario buscar nuevas estrategias farmacológicas que incrementen la actividad tripanocida de estos fármacos. Una de estas estrategias está orientada al manejo de la respuesta inflamatoria del hospedero a través de inhibidores de la síntesis de eicosanoides o moduladores de la respuesta inmune, mejorando así la respuesta antiparasitaria del hospedero.

Previamente, en nuestro laboratorio demostramos que aspirina un fármaco ampliamente utilizado, fue capaz de modular la disfunción endotelial previniendo el daño cardíaco en un modelo de infección crónica. Además, se evidenció la participación de 15-epi-LXA₄ en el efecto modulador de la respuesta inmune de aspirina [35-36]. Por otro lado, se han descrito otros grupos de fármacos que podrían tener un efecto beneficioso en la CCC, como las estatinas. Las estatinas son fármacos hipolipemiantes, cuyo mecanismo de acción más descrito es la inhibición de la HMGCoA reductasa, enzima limitante de la síntesis del colesterol. Sin embargo, se han descrito efectos independientes de su capacidad para inhibir la síntesis de colesterol. Estos efectos son denominados efectos pleiotropicos e incluyen acciones tales como la inhibición de la agregación plaquetaria [37], reducción de la inflamación en el endotelio vascular [38], y aumento del flujo coronario [39], entre otros.

Estudios en células endoteliales, han demostrado que atorvastatina y simvastatina pueden atenuar la expresión de E-CAMs, reduciendo el reclutamiento de células inflamatorias [40,41]. No obstante, existen otros autores que proponen que las estatinas pueden reducir la inflamación a través de la producción de un potente eicosanoide antiinflamatorio denominado 15-epi-Lipoxina A₄ ((5S, 6R, 15R)-5, 6,15-trihidroxi-7, 9,13-trans-11-ácido ciseicosatetraenoico) (15-epi-LXA₄). Este 15-epi-LXA₄ es un prostanoide

descrito como un producto alternativo de la actividad de COX-2, caracterizado tras la acetilación de COX-2 por aspirina [42,44].

Sin embargo, existen otras modificaciones de COX-2 que también podría dar cuenta de la generación de 15-epi-LXA₄, por ejemplo la iNOS puede modificar a la COX-2, a través de una S-nitrosilación en la cisteína 526 de COX-2. Esta modificación activa enzimáticamente a la COX-2 para generar prostaglandina H₂ (PGH₂) y ácido 15-hidroieicosatetraenoico (15-R-HETE), precursores de PGE₂ y 15-epi-LXA₄ respectivamente. Consecuentemente, las estatinas inducen un aumento en la expresión de COX-2 e iNOS [43].

La síntesis de 15-epi-LXA₄ también depende de la actividad de la 5-lipooxigenasa (5-LO). En ese sentido, se ha descrito que las estatinas activan a la proteinkinasa A (PKA), que fosforila a la 5-Lipooxigenasa (5-LO). Cuando 5-LO se encuentra fosforilada, no migra desde el citosol a la membrana perinuclear. Esta translocación es esencial para que interactúe con la fosfolipasa A2 citosólica (cPLA2) y así generar leucotrienos. Por el contrario, si la 5-LO permanece en el citosol, interactúa con la COX-2 para producir 15-epi-lipoxinas. De esta forma, las estatinas impiden la migración de la 5-LO redireccionando la ruta biosintética, para generar eicosanoides antiinflamatorios en vez de eicosanoides proinflamatorios como se muestra en la figura 2 [43].

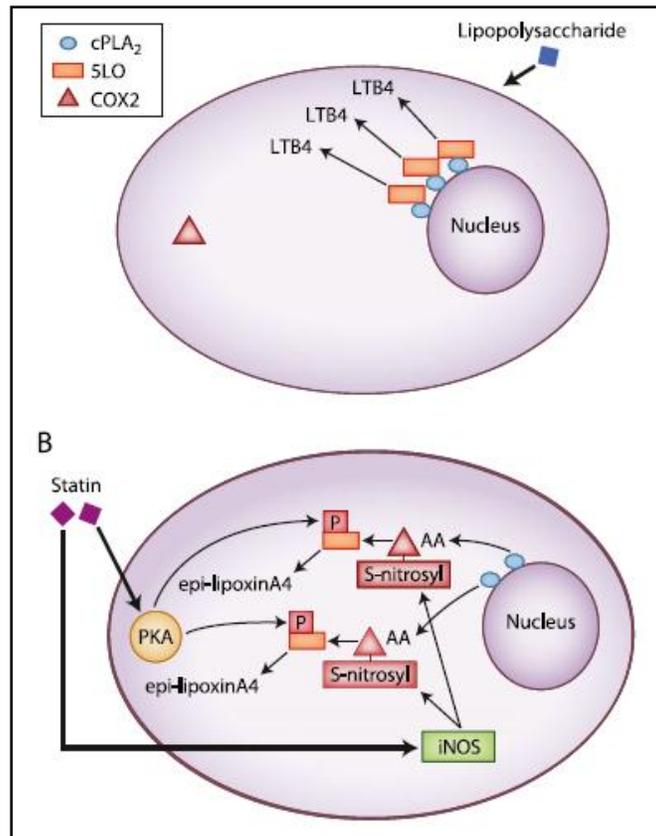


Figura 2. Ruta biosintética de 15-epi-lipoxinas. Se muestra el *switch* que generan las estatinas, activando a PKA y aumentando la actividad de la iNOS, que S-nitrosila a la COX-2 para generar el precursor 15R-HETE, el cual es clivado por la 5-LO fosforilada por PKA para generar 15-epi-LXA₄ [43].

La 15-epi-LXA₄ actúa a través de un receptor de 7 dominios de transmembrana acoplado a proteína G (FPR2/ALX) inhibiendo la quimiotaxis, induciendo la actividad de la eNOS, inhibiendo la adherencia y trans migración de neutrófilos, y mejora la fagocitosis de leucocitos apoptóticos. La 15-epi-lipoxina A₄ también inhibe la producción de IL-6, TNF- α e IL-8. Finalmente, estudios en células microgliales demuestran que 15-epi-LXA₄ inhibe la activación de NF κ B, ERK1/2 y p38 [45].

Por otra parte, estudios previos han evaluado el efecto tripanocida de las estatinas asociado a la inhibición de la síntesis de ergosterol en el parásito, ya que éste es esencial para la sobrevivencia en los diferentes ciclos de vida. Algunos autores han observado disminución del crecimiento en epimastigotes aislados, disminución en la capacidad de infectar células mamíferas y disminución de las parasitemias *in vivo* [47-50]. Por lo tanto, estos antecedentes son claves en la hipótesis que simvastatina podría modular la fisiopatológica de la CCC.

En resumen, la patogénesis de la cardiopatía chagásica crónica involucra diversos mecanismos, incluyendo el daño microvascular que explica el daño miocárdico por isquemia y que al parecer comienza con la infección a nivel endotelial. Además, durante la infección con *T. cruzi*, se activa la cascada de señalización de NF κ B, promoviendo la expresión de quimokinas y citokinas pro-inflamatorias y posterior reclutamiento de células inflamatorias, a través del aumento de expresión de CAMs. A esto, se suma la evidencia de que benznidazol y estatinas inactivan a NF κ B [46,51], disminuyendo la expresión de CAMs y citokinas pro-inflamatorias. Además se sabe que las estatinas pueden generar 15-epi-lipoxinas, un potente antiinflamatorio que participa en la inactivación de NF κ B. Así, se concluye que la función endotelial en la infección con *T. cruzi* puede mejorar en

presencia de estos fármacos, juntos o por separado, ya que ejercen un mecanismo similar.

Pocos estudios han descrito el rol de las estatinas durante la inflamación gatillada por *T. cruzi*. En modelos de cardiopatía aguda y crónica se observó que la simvastatina disminuyó la inflamación cardíaca y algunos mediadores inflamatorios [52,53]. Sin embargo, no se conoce el efecto de estatinas y benznidazol sobre la actividad endotelial en la infección por *T. cruzi*, ni tampoco los mecanismos moleculares involucrados. Por lo tanto, en la búsqueda de una estrategia terapéutica que permita mejorar la eficacia clínica de benznidazol se plantea la siguiente hipótesis.

II. HIPOTESIS

El tratamiento con simvastatina o benznidazol disminuye la adhesión celular, a través, de la disminución de la expresión de moléculas de adhesión mediada por la producción de 15-epi-LXA₄ en un modelo de activación endotelial humana inducido por *Trypanosoma cruzi*.

III. OBJETIVOS

OBJETIVO GENERAL

Estudiar, en células endoteliales EA.hy926 activadas por la infección con *Trypanosoma cruzi*, el efecto de simvastatina o benznidazol sobre la adhesión celular, la expresión de ECAMs y la señalización involucrada en este efecto.

OBJETIVO ESPECIFICOS

1. Evaluar el efecto de simvastatina o benznidazol sobre la expresión de moléculas de adhesión celular como VCAM-1, ICAM-1 y E-selectina en la superficie de células EA.hy926, en contacto con el parásito y durante la multiplicación intracelular.
2. Evaluar el efecto de simvastatina o benznidazol sobre la adhesión celular entre células HL-60 y EA.hy926 infectadas con *T. cruzi*.
3. Evaluar el efecto de simvastatina o benznidazol sobre la señalización de NFκB en un modelo de activación endotelial por *T. cruzi*.
4. Determinar la producción y participación de 15-epi-lipoxina-A₄ inducida por simvastatina en células EA.hy926 infectadas por *T. cruzi*.
5. Evaluar el efecto de 15-epi-lipoxina A₄ sobre la señalización de NFκB y la expresión de ECAMs en este modelo de infección endotelial con *T. cruzi*.

IV. MATERIALES Y MÉTODOS

Líneas Celulares

Células EA.hy926 (ATCC® CRL2922™): presentan funciones características de células endoteliales de vena umbilical humana, producto de la fusión de células de vena umbilical humana primaria con un clon de A549 resistente a tioguanina y expuesta a polietilenglicol. Los clones híbridos fueron seleccionados en medio HAT por la expresión del factor VIII. Las células fueron cultivadas con Iscove's Modified Dulbecco's Medium (IMDM, Biological industries # 01-058-1) suplementado con suero fetal bovino al 10% v/v y PenicilinaG/Estreptomicina sulfato (100 U/mL/100 mg/mL), a 37°C y 5% de CO₂.

Células HL-60 (ATCC® CCL240™): línea celular promielocítica derivada de leucemia humana descrita por J. Collins et al [44]. Las células fueron cultivadas con Iscove's Modified Dulbecco's Medium (IMDM, Biological industries # 01-058-1) suplementado con suero fetal bovino al 10% v/v y PenicilinaG/Estreptomicina sulfato (100 U/mL/100 mg/mL), a 37°C y 5% de CO₂.

Células HUVEC (C-015-10C, Cascade Biologics™ Invitrogen): son células endoteliales primarias de vena umbilical de múltiples donadores. Las células fueron cultivadas en Medium 200 (Gibco® M-200-500) suplementado con LSGS (Low serum growth supplement: Fetal bovine serum 2%v/v; Hidrocortisona 1µg/mL; Factor de crecimiento epidermal 10 ng/mL; Factor de crecimiento para fibroblastos 3 ng/mL y Heparina 10µg/mL) (Gibco® S-003-10).

Los tripomastigotes de *T. cruzi* (clon Dm28c), fueron obtenidos de los sobrenadantes de cultivos de EA.hy926 previamente infectados en una relación células: parásito 1:5 durante 24 horas. Al cuarto día post-infección, los tripomastigotes liberados fueron recolectados para evaluar viabilidad y conteo para las siguientes infecciones.

Ensayo de viabilidad celular

Se utilizó el ensayo de reducción de sales de tetrazolio [54]. Se sembraron $2,5 \times 10^5$ células EA.hy926 o HUVEC en una placa de 96 pocillos y se mantuvieron con medio fresco durante 12 horas. Posteriormente se incubaron con concentraciones crecientes de simvastatina (1 - 500 μM , Sigma-Aldrich, USA) y benznidazol (0,5 - 100 μM , Roche USA) durante 24 horas, el mismo diseño se aplicó para las células HL-60. Para los tripomastigotes aislados se sembraron 1×10^6 por pocillo y se incubaron con similares concentraciones de simvastatina durante 24 horas. Luego, las células y parásitos fueron lavados y se agregó a cada pocillo 100 μL de MTT o MTT-fenazina (5 mg/mL – 0,22 mg/mL, Sigma-Aldrich, USA) en medio sin rojo fenol. La incubación se realizó durante 2 horas para las células y por 4 horas para los parásitos a 37°C. Al término de este tiempo se agregaron 100 μL de solubilizante (SDS 10% en HCl 0,01 M). Las placas fueron incubadas toda la noche a 37°C. La densidad óptica fue determinada a través de un lector de microplacas (Labsystems Multiskan MS, Finlandia) a 570 nm.

Para el ensayo de viabilidad por incorporación de Ioduro de propidio, se sembraron 3×10^5 células EA.hy926 o HUVEC y 5×10^5 parásitos en placas de 24 pocillos y se incubaron con

simvastatina en las mismas concentraciones que en el ensayo de MTT durante 24 horas. Luego se agregó 2 µL de ioduro de propidio a 10,5 mg/mL a cada pocillo e inmediatamente las células se homogenizaron suavemente para analizar por citometria de flujo.

Expresión de ECAMs por citometria de flujo

Se sembraron 5×10^5 células EA.hy926 o HUVEC en placas de 6 pocillos por 12 horas, luego fueron lavadas y se agregaron los parásitos aislados de *T. cruzi* en una relación célula: parásito de 1:10 y se evaluó la cinética de activación endotelial durante 2, 4, 16, 24, 48 y 72 horas. Para la evaluación del efecto farmacológico, las células fueron pre-incubadas con simvastatina a 1, 5 y 10 µM y benznidazol a 1, 10 y 20 µM en DMSO al 0,1% concentración final, durante 24 horas, luego se lavaron y se infectaron con parásitos aislados de *T. cruzi* en una relación célula: parásito 1:10 durante 16 horas. Después de lavar con PBS frío, las células se desprendieron con una solución de EDTA-PBS 1X a 0,5 mM, y tras lavarlas 2 veces con *Buffer Staining flow cytometry* frío se incubaron con anticuerpos monoclonales de ratón contra E-selectina; ICAM-1 y VCAM-1 conjugados con PE; FITC y APC respectivamente (Biolegend®). La fluorescencia asociada a la superficie celular fue detectada por citometria de flujo (*FACSaria II, BD technologies*).

Expresión de ECAMs por inmunofluorescencia indirecta

Se sembraron 2×10^4 células EA.hy 926 en cámaras Lab-Tek® II Chamber Slide™ por 12 horas, luego se incubaron con simvastatina 5 μ M y benznidazol 20 μ M durante 24 horas. Al término de este tiempo se agregaron tripomastigotes aislados de *T. cruzi* en la relación 1:10 durante 16 horas. Posteriormente las células fueron lavadas y fijadas con paraformaldehído 4% durante 10 minutos, después de lavar las células fueron bloqueadas con suero albúmina bovino al 3% durante 1 hora e incubadas con los anticuerpos contra E-selectina 1:100 (sigma-aldrich® #9555), VCAM-1 1:250 (abcam® #ab134047) e ICAM-1 1:100 (abcam® #ab53013) a 4°C durante toda la noche. Luego, las células fueron lavadas 3 veces y se incubaron con un anticuerpo secundario conjugado a FITC (sigma-aldrich® #F0257-F0382) en una dilución de 1:100 durante 1 hora a temperatura ambiente y en oscuridad. Luego fueron lavadas e teñidas con DAPI (kit NucBlue™ Fixed Cell Stain, Molecular Probes®, Life technologies, USA) por 5 minutos y finalmente se agregó medio de montaje (Dako® Fluorescence Mounting) para su análisis por microscopía de epifluorescencia (Nikon Eclipse 400). Las imágenes fueron analizadas utilizando el software ImageJ (ImageJ 1.47v).

Expresión de ECAMs total por Western blot

Se sembraron 5×10^5 células EA.hy926 en placas de 6 pocillos durante 12 horas, luego fueron tratadas con simvastatina y benznidazol durante 24 horas previo a la incubación con parásitos aislados de *T. cruzi* en una relación célula: parásito 1:10 durante 16 horas. Posterior a este tiempo, las células fueron lavadas con PBS, raspadas y lisadas con 100

µL de Buffer RIPA (Radio-Immunoprecipitation Assay, Millipore Corporation, USA) más inhibidor de proteasas y fosfatasas. Posteriormente fueron centrifugadas (10.000xg por 15 minutos) y las proteínas totales fueron cuantificadas por el método de Lowry [55]. Las proteínas extraídas fueron mezcladas con buffer de carga (10% SDS, 50% glycerol, 0.5 M Tris, 0.1% bromphenol blue, and 1 M dithiothreitol, pH 6.8) y se cargaron 50 µg de proteína total en un gel de SDS-poliacrilamida al 10%. La electroforesis fue realizada a voltaje constante (100 Volts durante 90 minutos) y la transferencia a amperaje constante (400 mA por 80 minutos) en una membrana de nitrocelulosa. Luego de comprobar la transferencia con rojo ponceau, la membrana fue bloqueada con BSA al 3% en TBS-T 0,1% durante 1 hora a temperatura ambiente. Tras lavar 3 veces con TBS-T por 5 minutos, las membranas fueron incubadas con anticuerpos primarios de contra E-selectin (1:1000) y α-Tubulina (1:10.000) de Sigma-Aldrich; ICAM-1 (1:2000) y VCAM-1 (1:1000) from Abcam®; p-IKK (1:1000); IKK (1:1000); p-IKB (1:1000) y IKB (1:1000) de Cell signaling® , durante toda la noche a 4°C. Luego las membranas fueron lavadas 3 veces con TBS-T e incubadas con un anticuerpo secundario anti-IgG de conejo o ratón conjugado a HRP (1:5000 o 1:2000) durante 1 hora a temperatura ambiente. Las membranas fueron desarrolladas a través de quimioluminiscencia usando Lumminata forte® (Millipore Corporation, USA). Para cada incubación, los anticuerpos fueron removidos de la membrana de nitrocelulosa utilizando Mild stripping™ (Millipore, USA) por 10 minutos. Los films desarrollados fueron escaneados y la densitometría de las bandas fue analizada usando el software ImageJ (ImageJ 1.47v).

Determinación de amastigotes intracelular

Se sembraron 2×10^4 células EA.hy 926 en cámaras Lab-Tek® II Chamber Slide™ por 12 horas, luego se agregó medio fresco con las distintas concentraciones de simvastatina y benznidazol durante 24 horas. Posteriormente se agregaron tripomastigotes aislados de *T.cruzi* clon Dm28c en la relación 1:10 por 16 horas. Las células fueron lavadas para eliminar los parásitos que no ingresaron y se mantuvieron con medio fresco hasta las 72 horas, tiempo al cual las células fueron fijadas con metanol frío toda la noche a 4°C. Posteriormente, fueron lavadas con PBS y teñidas con DAPI (kit NucBlue™ Fixed Cell Stain, Molecular Probes®, Life technologies, USA) por 5 minutos, finalmente se agregó medio de montaje (Dako®, DakoCytomation, Dinamarca) y se analizaron por microscopía de epifluorescencia (Nikon Eclipse 400). Las imágenes fueron analizadas utilizando MATLAB software.

Ensayo de integridad de citoesqueleto

Se sembraron 2×10^4 células EA.hy 926 en cámaras Lab-Tek® II Chamber Slide™ por 12 horas. Luego fueron incubadas con simvastatina 1, 5, 7.5 y 10 μM durante 24 horas. Al término, las células fueron lavadas una vez y fijadas con paraformaldehído al 3,7% en PBS por 10 minutos. Luego fueron permeabilizadas con buffer de permeabilización (F-Actin Visualization Biochem Kit™, Cytoeskeleton, USA) por 5 minutos, se lavaron e incubaron con Faloidina conjugada a isotiocianato de tetrametilrodamina (F-Actin Visualization Biochem Kit™, Cytoeskeleton, USA) por 30 minutos para ser visualizadas por microscopía de epifluorescencia (Nikon Eclipse 400). Las imágenes fueron analizadas utilizando ImageJ software (ImageJ 1.47v).

Para determinar la adhesión se utilizó un kit CytoSelect™ Leukocyte-Endothelium Adhesion Assay, Cell Biolabs, (CBA-210; Cell Biolabs). EA.hy926 o HUVEC semi-confluentes fueron sembradas en placas de 96 pocillos y tratadas con simvastatina a 1, 5 y 10 μM y benznidazol a 1, 10 y 20 μM en DMSO al 0,1% concentración final. Después de 24 horas de incubación se agregaron parásitos aislados de *T. cruzi* en una relación 1:10 durante 16 horas. Por otro lado, los leucocitos (células HL-60) fueron marcados con Leuko Tracker® por 1 hora. Posteriormente se co-incubaron las células endoteliales con los leucocitos marcados por 90 minutos. Al término de este tiempo cada pocillo se lavó para remover los leucocitos que no se adhirieron y se lisaron las células para medir la fluorescencia a 480 nm excitación/520 nm emisión. El porcentaje de leucocitos adheridos fue calculado como: % adherencia = señal adherencia/señal total. Todas las determinaciones fueron realizadas por triplicado utilizando un lector de placa con filtro de fluorescencia (Varioskan, Thermo Scientific®).

1. Ensayo de ELISA: Se sembraron 8×10^5 células EAhy926 cells en placas de 6 pocillos. Las células fueron tratadas con simvastatina por 24 horas e infectadas con tripomastigotes de *T. cruzi* en una relación de 1:10 (célula:tripomastigotes) por 16 horas. Posteriormente los sobrenadantes fueron evaluados para determinar la concentración de 15-epi-LXA₄ por BioAssay ELISA Kit (USBiological, USA) siguiendo las instrucciones del fabricante.

2. Determinación por espectrometría de masas AxION DSA–TOF MS: Se sembraron 4×10^5 células EAhy926 cells en placas de 12 pocillos. Las células fueron tratadas con simvastatina por 24 horas e infectadas con tripomastigotes de *T. cruzi* en una relación de 1:10 (célula:tripomastigotes) por 16 horas. Posteriormente los sobrenadantes de cultivo fueron extraídos y analizados por un ensayo de muestra directa (AxION Direct Sample Analysis) integrado con un espectrómetro de masas AxION 2 time-of-flight (TOF) (PerkinElmer, Shelton, CT, USA). Para la extracción, todas las muestras fueron cargadas en una fase sólida de extracción y fueron eluidas con 1 mL de cloroformo tres veces sucesivamente. Las muestras fueron transferidas a un tubo khan limpio para la posterior evaporación del cloroformo en un baño de agua. Finalmente, las muestras fueron resuspendidas en 100 µl de etanol absoluto y se cargaron gotas de 10 µl en una malla de acero inoxidable. Para la curva de calibración se utilizó un estándar de 15-epi-lipoxin A₄ (Cayman Chemical #90415), diluido en medio de cultivo para obtener las diferentes concentraciones. Las condiciones del ensayo de muestra directa (AxION DSA) fueron las siguientes: corona current de 5 µA, Temperatura del calentador de 250 °C, presión del gas auxiliar (N₂) 80 psi, flujo de gas de secado (N₂) de 4 L/min, y temperatura del gas de

secado (N₂) de 25 °C. Se utilizó un modo trap negativo con un flujo de voltaje de 10000 V. La tensión de salida de los capilares fue de 155 V para un análisis de MS normal. El espectro de masa fue adquirido con un rango de masas de 100–1000 m/z y una tasa de adquisición de 2 espectros/ segundo. Para mantener la exactitud de la masa, se utilizaron tres calibradores de masa iónica (m/z 119,0400, m/z 556,0000 and m/z 805,9900). Todas las muestras fueron analizadas por 10 segundos. Se utilizó un estándar de 15-epi-lipoxina A₄ (Cayman Chemical #90415) y 5(S),6(R)-Lipoxin A₄ methyl ester (Cayman Chemical #10033) como control interno. Estos fueron confirmados por masa exacta, distribución isotópica y fragmentación de iones usando DSA/TOF y AxION software. Todas las muestras fueron analizadas por triplicado. En la figura 3 se muestra una determinación representativa de 15-epi-LXA₄ por DSA–TOF MS. El recuadro corresponde a la curva de calibrado del estándar 15-epi-LXA₄ utilizada para interpolar las muestras experimentales.

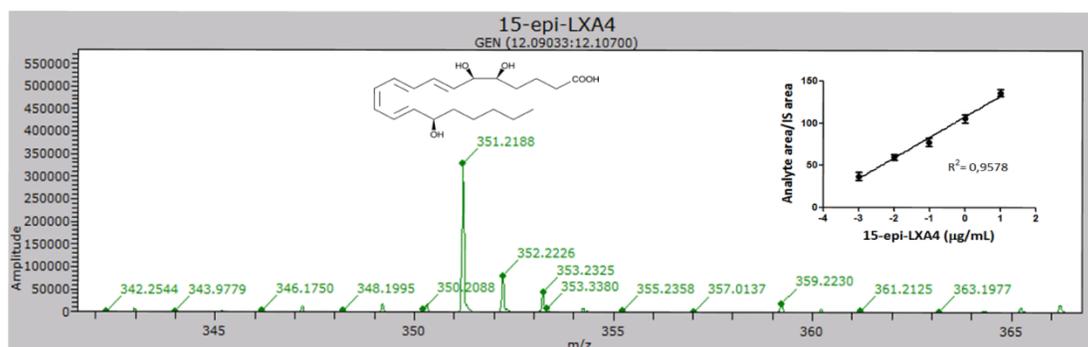


Figura 3. Espectro de masa representativo del estándar de 15-epi-LXA₄. Para realizar la curva de calibrado, se prepararon diferentes concentraciones de 15-epi-LXA₄ diluido en etanol. De cada concentración se cargó 10 µl en la malla de acero inoxidable por triplicado y se determinó por DSA–TOF y AxION software. Todas las muestras fueron analizadas por 10 segundos. La gráfica muestra la curva utilizada para calcular las concentraciones en las muestras experimentales que se muestran en la tabla 1.

Se sembraron 2×10^4 células EA.hy 926 en cámaras Lab-Tek® II Chamber Slide™ por 12 horas, luego se incubaron con simvastatina 5 μ M y benznidazol 20 μ M durante 24 horas. Al término de este tiempo se agregaron tripomastigotes aislados de *T.cruzi* en la relación 1:10 durante 16 horas. Las células fueron lavadas con PBS 1X tibio por 30 segundos 1 vez y se fijaron con PFA 4 % en PBS pH 7,4 fresco durante 15 minutos a temperatura ambiente. Después de fijar, se lavaron con PBS 1X 3 veces por 5 minutos y se permeabilizaron con Tritón x-100 0,5% en PBS 1X durante 10 minutos a 4°C. Cada pocillo fue lavado 3 veces x 10 minutos con glicina 200 mM en PBS y bloqueado con BSA 3% en PBS por 1 hora a temperatura ambiente. Posterior al bloqueo se incubaron con anticuerpo monoclonal anti- NF- κ B p65 (cell signaling® #D14E12) en una dilución 1:100 en solución de bloqueo a 4°C toda la noche. Luego de lavar con Buffer IF 3 veces por 5 minutos se incubó con el anticuerpo secundario anti-IgG rabbit conjugado a FITC en una dilución 1:200 en solución de bloqueo por 45 minutos a temperatura ambiente en oscuridad. Posterior al lavado con Buffer IF 3 veces por 5 minutos, las células fueron teñidas con DAPI (kit NucBlue™ Fixed Cell Stain, Molecular Probes®, Life technologies, USA) por 5 minutos y finalmente se agregó medio de montaje (Dako® Fluorescence Mounting) para su análisis por microscopía confocal (Olympus Spinning disk confocal). Se obtuvieron 10 fotografías por pocillo y fueron analizadas utilizando el software ImageJ (ImageJ 1.47v).

Los resultados fueron expresados como promedios \pm desviación estándar de tres experimentos independientes. El $n=3$ corresponde al mínimo número de experimentos requeridos para tener un 95% de confianza, dada la variabilidad de los estudios *in vitro* propuestos. Para evaluar la normalidad de datos continuos se realizó el test de Shapiro-Wilk. El análisis de varianza se realizó con ANOVA de una vía seguido de un test de Tukey para múltiples comparaciones. En los experimentos tiempo y concentración dependiente se realizó una ANOVA de dos vías con un post-test de Bonferroni. Un valor de $p < 0,05$ fue considerado estadísticamente significativo. Todos los análisis estadísticos se realizaron en el software GraphPad Prism 5 (GraphPad software, Inc).

V. RESULTADOS

OBJETIVO 1. Evaluar el efecto de simvastatina y benznidazol sobre la expresión de moléculas de adhesión celular como VCAM-1, ICAM-1 y E-selectina en la superficie de células EA.hy926, en contacto con el parásito y durante la multiplicación intracelular.

Para evaluar la expresión de ECAMs en nuestros modelos de activación endotelial, células EA.hy926 y células HUVEC fueron estimuladas con parásitos aislados de *T. cruzi* en una relación célula: parásito de 1:10 a 2, 4, 16, 24, 48 y 72 horas para establecer la cinética de expresión frente al parásito (Figura 4). Se observó que E-selectina; ICAM-1 y VCAM-1 aumentaron significativamente su expresión en la superficie a partir de las 16 horas y este efecto fue tiempo dependiente en ambas líneas celulares. Sin embargo, el comportamiento de expresión es levemente diferente en cada modelo, ya que en las células EA.hy926 tienen un máximo de expresión a las 16 horas cuya expresión se mantuvo hasta las 48 horas con una tendencia a disminuir a las 72 horas (Figura 4A). Por otro lado, en las células HUVEC la expresión aumenta significativamente a las 16 horas presentando un máximo de expresión a las 48 horas, que declina a las 72 horas. Sólo ICAM-1 presenta una expresión sostenida en el tiempo (Figura 4B), probablemente debido a la expresión constitutiva de ICAM-1 [56], como se observa en los histogramas, ya que existe una señal mayor que el control de isotipo en ambas líneas celulares (Figura 4C y 4D). Es importante destacar que la expresión de ECAMs se mantiene a las 48 y 72 horas, es decir, cuando el parásito está en su estado de amastigote o forma replicativa. Estos resultados nos permitieron definir las 16 horas como tiempo óptimo para la determinación de las ECAMs en nuestros modelos de estudio.

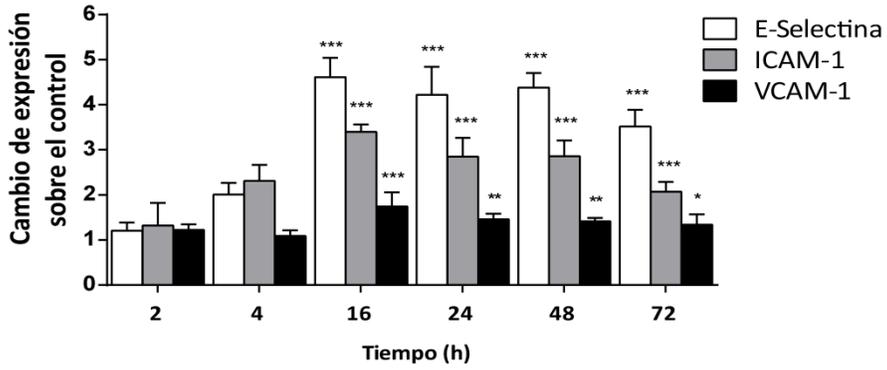
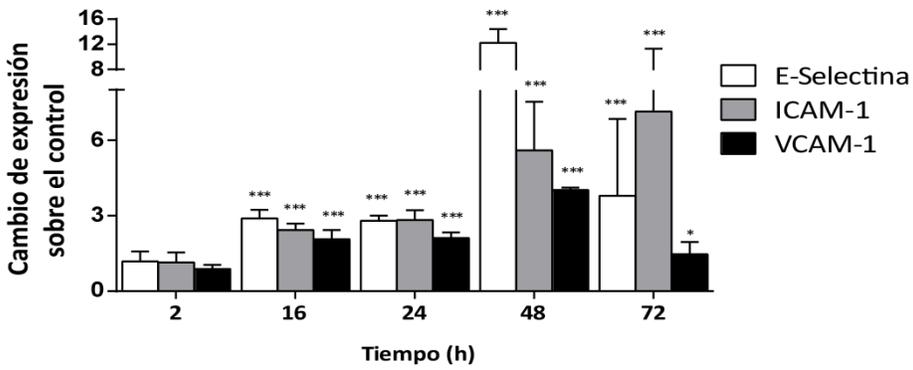
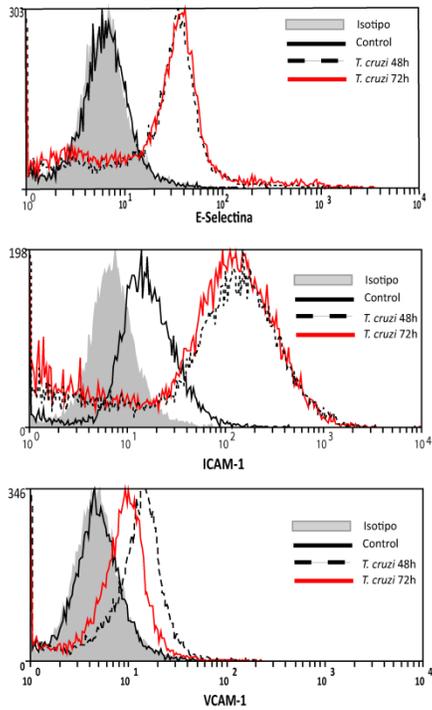
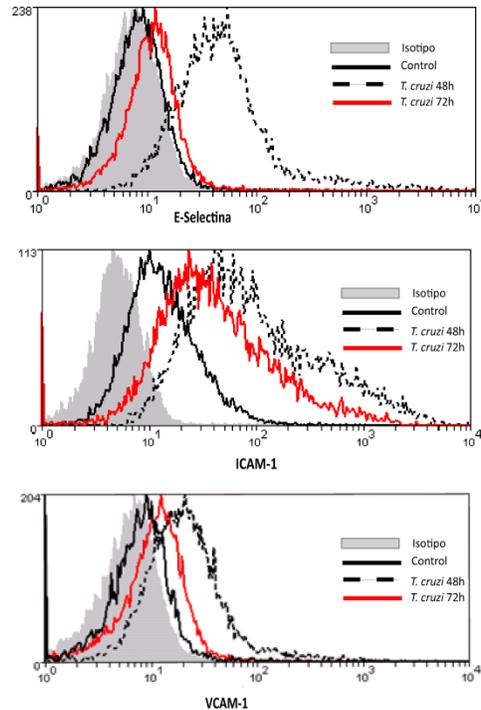
A**B****C****D**

Figura 4. *Trypanosoma cruzi* aumenta la expresión de ECAMs en células EA.hy926 y HUVEC. Células EAhy926 (**A, C**) y HUVEC (**B, D**) fueron infectadas con tripomastigotes de *T. cruzi* (Dm28c) en relación 1:10 (células: parásitos). La expresión de E-Selectina, ICAM-1 y VCAM-1 fue determinada al tiempo indicado en la figura. El análisis fue realizado por citometría de flujo utilizando anticuerpos monoclonales IgG de ratón conjugado con PE, FITC, y APC, contra E-Selectina, ICAM-1, y VCAM-1 humana, respectivamente. En los paneles A y B se muestra la intensidad de fluorescencia media (MFI) y en los paneles C y D se muestra los histogramas representativos de 48 y 72 horas post-infección. Cada grupo fue comparado y normalizado a su respectivo control de isotipo IgG₁ e IgG_{2A}. Los Datos representan el promedio \pm DE de MFI de tres experimentos independientes. *** $p < 0,0001$; ** $p < 0,01$; * $p < 0,5$ vs control no infectado utilizando ANOVA de dos vías y post-test de Bonferroni.

A continuación, se evaluó el efecto de simvastatina 5 μM o benznidazol 20 μM por 24 horas y la posterior infección con tripomastigotes de *T. cruzi* por 16 horas sobre la expresión de ECAMs en ambas líneas celulares. Las concentraciones usadas de ambos fármacos correspondieron a las que presentaron un mejor efecto sobre la expresión de ECAMs sin demostrar efecto citotóxico sobre ambas líneas celulares (Figura suplementaria 1), y sin afectar la integridad de citoesqueleto (Figura suplementaria 2). En la figura 5A-D se muestra que simvastatina 5 μM o benznidazol 20 μM son capaces de prevenir significativamente el aumento de expresión de E-selectina, ICAM-1 y VCAM-1, inducida por *T. cruzi*, tanto en células EA.hy926 como en HUVEC. Además, en células EAhy926 se observa que a concentración 1 μM de simvastina comienza a disminuir la expresión de ECAMs, siendo sólo significativa para ICAM-1 (Fig. suplementaria 3). En cuanto a benznidazol, a concentraciones de 1 y 10 μM es capaz de prevenir significativamente la expresión en la superficie de E-selectina, ICAM-1 y VCAM-1 (Fig. suplementaria 3). En la figura 5E y 5F se observan similares resultados por inmunofluorescencia indirecta. Esto indica que ambos fármacos pueden prevenir la activación endotelial después de la infección inicial por *T. cruzi in vitro*.

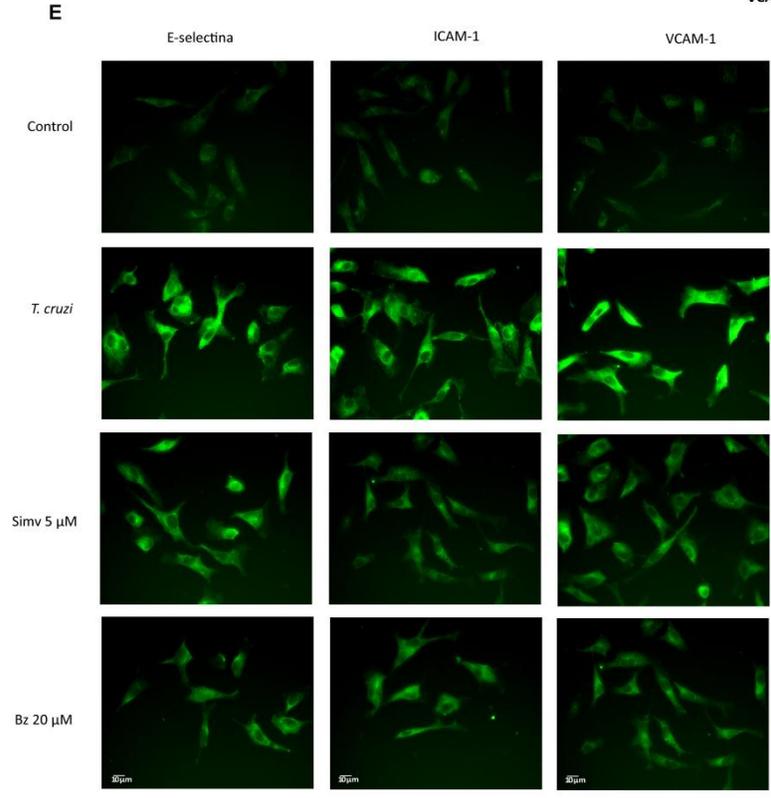
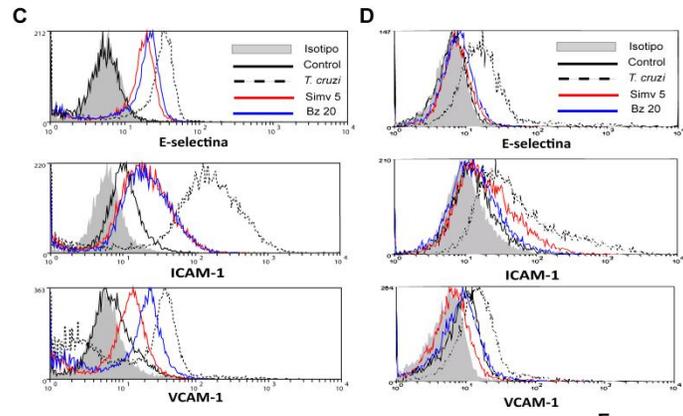
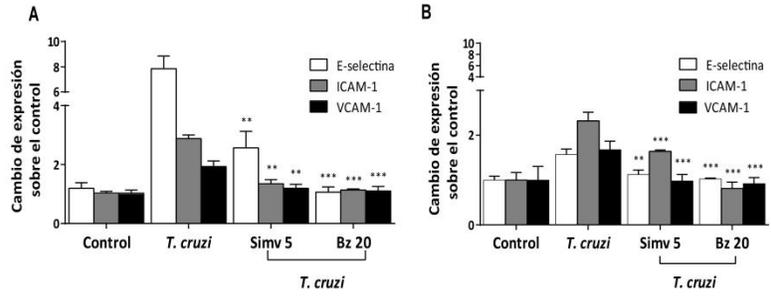


Figura 5. Simvastatina o benznidazol disminuyen la expresión de ECAMs sobre la superficie de células endoteliales durante la infección con *Trypanosoma cruzi*. Células endoteliales EA.hy926 y HUVEC fueron incubadas con simvastatina 5 μ M (Simv) o benznidazol 20 μ M (Bz) durante 24 horas. El medio de cultivo fue removido y se agregó medio fresco con tripomastigotes de *T. cruzi* (Dm28c) en una relación 1:10 (células: parásitos) durante 16 horas. La expresión de E-Selectina, ICAM-1, y VCAM-1 sobre las células EA.hy926 (**A, C**) y HUVEC (**B, D**) fue determinada por citometría de flujo utilizando anticuerpos monoclonales IgG de ratón conjugado con PE, FITC, y APC, contra E-selectina, ICAM-1, y VCAM-1 humana, respectivamente. **A** y **B.** se muestra la intensidad de fluorescencia media (MFI). **C** y **D.** Histogramas representativos de cada condición experimental. Cada grupo fue comparado y normalizado a su respectivo control de isotipo IgG₁ e IgG_{2A}. **E.** Células EA.hy926 fueron lavadas con PBS e incubadas con anticuerpos monoclonales anti E-selectina, ICAM-1, y VCAM-1 humana seguido de la incubación con un anticuerpo secundario conjugado a FITC. **E.** Fotografías representativas de cada grupo (40X). **F.** Análisis cuantitativo de la fluorescencia relativa para cada molécula de adhesión. Los datos representan el promedio \pm DE de MFI de cuatro experimentos independientes. *** $p < 0,001$; ** $p < 0,01$; versus el control infectado (*T. cruzi*) utilizando ANOVA de dos vías y post-test de Bonferroni.

La disminución de la expresión de ECAMs, como resultado de la administración de simvastatina o benznidazol podría deberse a diversos factores, como internalización de las moléculas desde la superficie celular o cambio de la expresión total de estas proteínas. En la figura 6 se muestra la determinación del contenido total de E-selectina (Fig. 6A), ICAM-1 (Fig. 6B) y VCAM-1 (Fig. 6C). Se observa que *T. cruzi* aumenta la expresión total de E-selectina, ICAM-1 y VCAM-1, en concordancia con lo observado en la Figura 5 y que simvastatina 5 μ M y benznidazol 20 μ M fueron capaces de disminuir significativamente la expresión de ICAM-1 VCAM-1 con respecto a las células infectadas. No obstante, en el caso E-selectina se observa sólo una tendencia, que no es estadísticamente significativa. Esto permite sugerir que ambos fármacos previenen la activación de mecanismos intracelulares de expresión gatillados por el parásito.

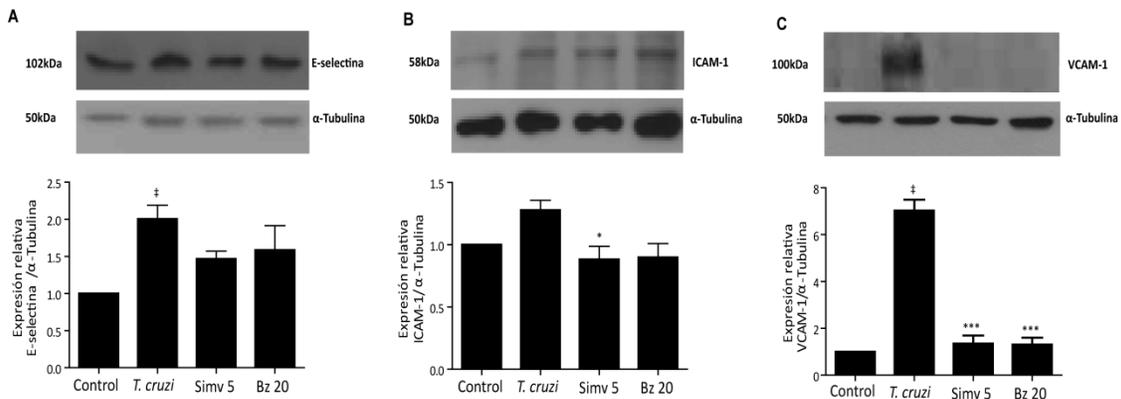


Figure 6. Simvastatina o benznidazol disminuyen la expresión total de ECAMs durante la infección con *Trypanosoma cruzi*. EA.hy926 fueron incubadas con 5 μ M de simvastatina o 20 μ M benznidazol por 24 horas. Después de lavar con medio fresco, las células fueron infectadas con tripomastigotes de *T. cruzi* (Dm28c) a una relación 1:10 (células: parásitos). Después de 16 horas de infección, las células fueron cosechadas y se determinó el total de expresión de E-Selectina (A), ICAM-1 (B) y VCAM-1 (C) por western blot. Los paneles corresponden a la imagen representativa de la banda y las gráficas a la cuantificación relativa de la intensidad de la banda. α -Tubulina fue utilizado como control de carga. Los datos son expresados como promedio \pm DE de cuatro experimentos independientes. El análisis de varianza fue realizado con ANOVA de una vía y post-test de Tukey. * $p < 0,05$; *** $p < 0,001$ vs *T. cruzi*.

Como consecuencia de los resultados anteriores, se podría inferir que la disminución en la expresión de ECAMs se debe al efecto tripanocida de ambos fármacos. Para descartar esta posibilidad, se determinó la carga intracelular de amastigotes en células EA.hy926 tratadas con simvastatina o benznidazol y la posterior infección con *T. cruzi*. La figura 7 muestra que la carga de amastigotes no cambia significativamente, a diferencia cuando los fármacos se administran post-infección (Figura 8). Por lo tanto la disminución de la expresión no está influenciada por el efecto tripanocida de estos fármacos

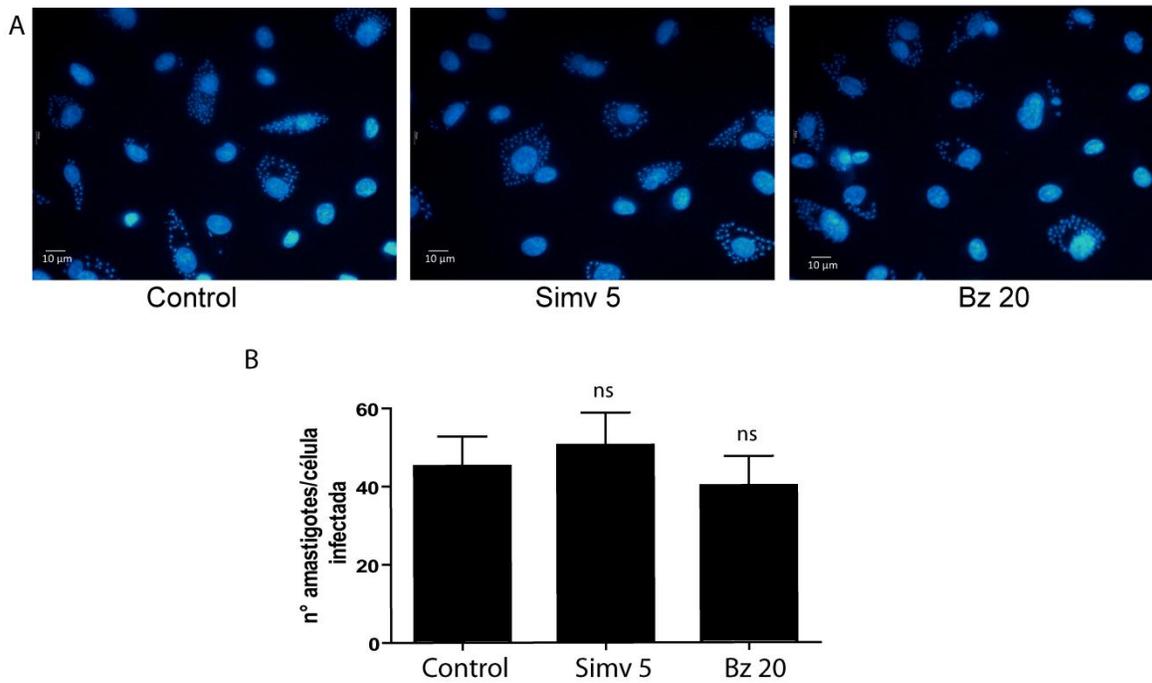


Figure 7. El tratamiento con simvastatina o benznidazol previo a la infección con *T. cruzi* no afecta la carga de amastigotes intracelular. Células EA.hy926 fueron tratadas con simvastatina 5 μ M o benznidazol 20 μ M durante 24 horas. Luego, el medio de cultivo fue cambiado por medio fresco con tripomastigotes de *T. cruzi* (Dm28c) por 16 horas. Al término, el medio de cultivo fue cambiado por medio fresco hasta las 72 horas de cultivo. Finalmente, las células fueron fijadas con metanol frío y teñidas con DAPI. **A.** Microfotografías representativas de cada condición (40X) **B.** Cuantificación del número de amastigotes por célula infectada por cada grupo experimental. Los datos están expresados como promedio \pm DE de tres experimentos independientes. ns: no muestran diferencia estadística después de un análisis de ANOVA de una vía.

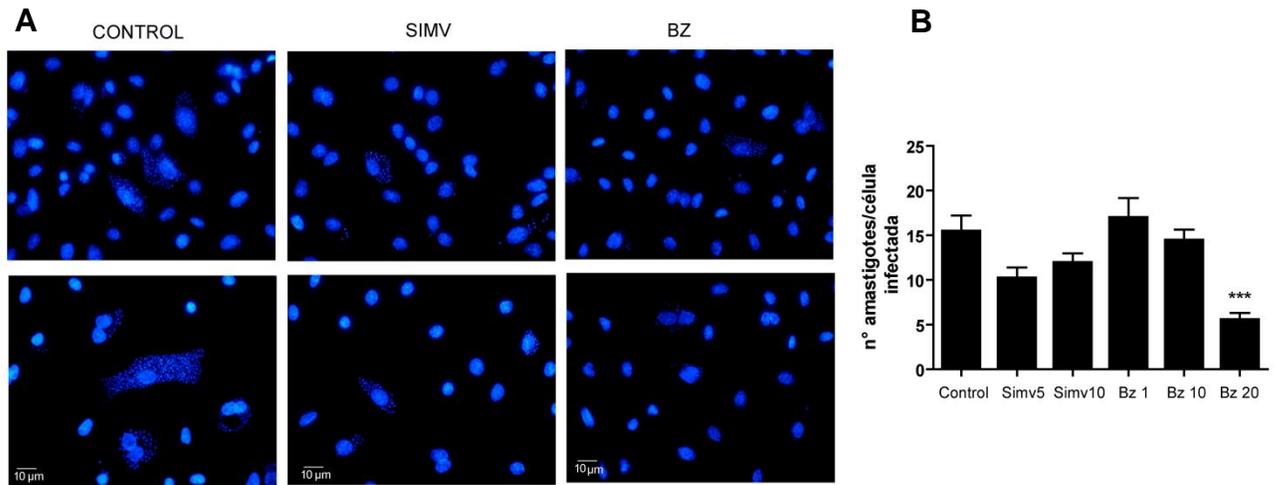


Figura 8. Simvastatina o benznidazol disminuyen la carga de amastigotes intracelulares postinfección. Se infectaron células EA.hy926 con tripomastigotes de *T. cruzi* por 24 horas. Luego fueron lavadas y tratadas con simvastatina 5 y 10 μM o benznidazol 1, 10 y 20 μM a las 24 y 48 horas post-infección. Finalmente las células fueron fijadas y teñidas con DAPI. **A.** Microfotografías representativas de cada condición experimental (40X) **B.** Cuantificación del porcentaje de amastigotes por célula infectada. Los datos son expresados como promedio \pm DE de 3 experimentos independientes. *** $p < 0,001$ vs control calculado por ANOVA de una vía y post-test de tukey.

OBJETIVO 2: Evaluar el efecto de simvastatina y benznidazol sobre la adhesión celular entre células EA.hy926o HUVEC con HL-60 durante la infección con *T. cruzi*.

De acuerdo con los resultados anteriores, simvastatina o benznidazol, administrados previo a la infección, previenen la activación endotelial. Pero es importante aclarar si la disminución de la expresión de ECAMs es suficiente para provocar el efecto funcional de disminuir la adhesión de leucocitos a células endoteliales. Para esto, se realizó un ensayo de adhesión utilizando células HL-60 marcadas con Leuko Tracker™, las cuales fueron co-incubadas con células endoteliales infectadas con *T. cruzi*. Como se aprecia en las figuras 9A y 9B, el porcentaje de adherencia de células HL-60 a células endoteliales aumentó significativamente en la infección con el parásito y disminuyó con la pre-incubación con simvastatina o benznidazol a valores similares al control. Este hallazgo es importante porque relaciona la disminución de la expresión de ECAMs con la consecuente reducción de la adhesión de leucocitos al endotelio, evento inicial de la respuesta inflamatoria. Estos resultados indican que ambos fármacos impiden la adhesión entre células endoteliales y leucocitos.

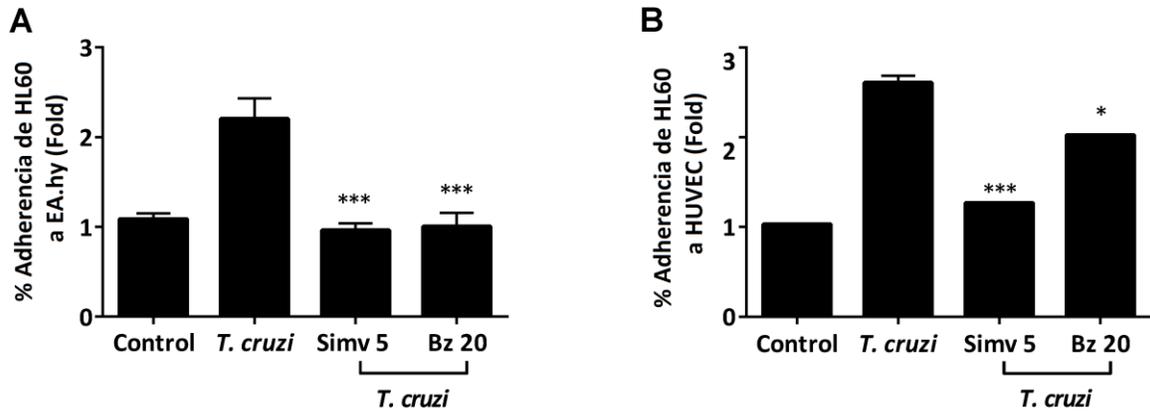


Figure 9. Simvastatina y benznidazol disminuyen la adhesión celular durante la infección con *Trypanosoma cruzi*. Células EA.hy926 (A) o HUVEC (B) fueron incubadas con simvastatina 5 μ M y benznidazol 20 μ M durante 24 horas. Posteriormente, el medio de cultivo fue reemplazado por medio fresco con tripomastigotes de *T. cruzi* e incubados por 16 horas. Se marcaron células HL-60 con Leuko Tracker™ y a continuación fueron agregadas a la monocapa de células endoteliales durante 90 minutos. Después de lavar con PBS, las células fueron lisadas y la fluorescencia fue detectada a 480/520 nm. Las gráficas muestran el promedio \pm DE del porcentaje de adherencia con respecto al control de tres experimentos independientes. El análisis de varianza se realizó por ANOVA de una vía y post-test de Tukey. * $p < 0,05$; *** $p < 0,001$ versus el control infectado sin tratamiento (*T. cruzi*).

OBJETIVO 3: Evaluar el efecto de simvastatina y benznidazol sobre la señalización de NFkB en un modelo de activación endotelial por *T. cruzi*.

Para evaluar el efecto de ambos fármacos sobre la activación de NFkB, se determinó la expresión de IKK e IκB y sus formas fosforiladas p-IKK y p-IκB por western blot. Para determinar la cinética de expresión de estas moléculas, en presencia del parásito, las células EA.hy926 fueron incubadas con tripomastigotes durante 120 minutos y se evaluó la expresión a diferentes tiempos como indica la Figura 10A-B. Después de 60 minutos de incubación, se observó un significativo aumento de la expresión de p-IKK respecto a IKK y de p-IκB respecto a IκB y de las células no estimuladas (figura 10A y 10B). Las células fueron incubadas con simvastatina o benznidazol durante 60 minutos, previo a la infección *T. cruzi*, observando una significativa disminución de la fracción fosforilada de ambas proteínas (figura 10C-D). Por lo tanto, NFkB es modulado por simvastatina y benznidazol, previniendo la activación de la vía de NFkB inducida por *Trypanosoma cruzi*. Esta afirmación se ve reforzada por el hecho que la migración de p65 al núcleo, inducida por *T. cruzi* a los 60 minutos de establecida la infección, disminuye cuando se administran previamente simvastatina o benznidazol (Figura 10E). Estos resultados sugieren que durante la infección con *T. cruzi* existe una activación de esta vía de señalización, lo que explicaría, al menos en parte, el aumento en la expresión de ECAMs y el aumento de la adherencia celular. Por otro lado, se observó que una pequeña fracción de p65 quedó remanente en el núcleo de las células tratadas con benznidazol, a diferencia de lo encontrado con simvastatina, por lo que inferimos que a pesar del efecto de ambas drogas, puede persistir una baja actividad inflamatoria regulada por NFkB.

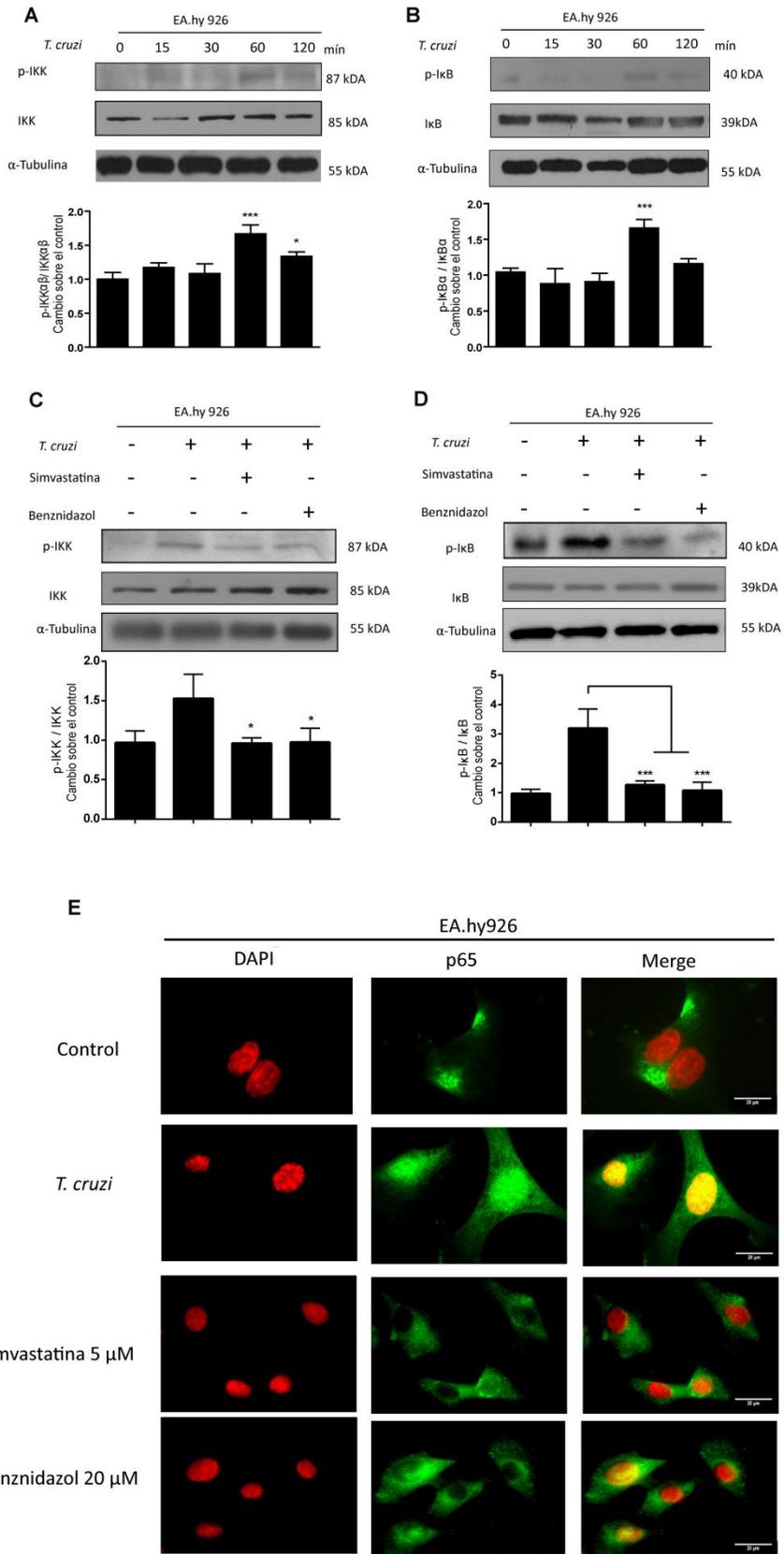


Figura 10. Simvastatina y benznidazol bloquean la activación de NFκB durante la infección de células EA.hy926 con *Trypanosoma cruzi*. Células EA.hy926 fueron incubadas con simvastatina 5 μM o benznidazol 20 μM por 24 horas. Después se incubó con tripomastigotes de *T. cruzi* (Dm28c) en una relación de 1:10 (células: parásitos) por 1 hora. A continuación, las células fueron cosechadas al tiempo que indica la figura para determinar el total de expresión de IKK, p-IKK, IκB, and p-IκB. **A.** Banda representativa de IKK y p-IKK en células sin tratamiento y la cuantificación de la intensidad relativa de la banda. **B.** Banda representativa de IκB y p-IκB en células sin tratamiento y la cuantificación de la intensidad de la banda. Los datos son expresados como promedio ± DE de cuatro experimentos independientes * p<0,05; *** p< 0,001 vs control (tiempo 0). **C.** Banda representativa para IKK y p-IKK en células preincubadas con simvastatina 5 μM o benznidazol 20 μM y estimuladas con *T. cruzi* por 60 minutos. **D.** Banda representativa para IκB y p-IκB en células preincubadas con simvastatina 5 μM o benznidazol 20 μM y estimuladas con *T. cruzi* por 60 minutos. Se utilizó α-tubulina como control de carga. Los datos son expresados como promedio ± DE de cuatro experimentos independientes. * p<0,05; *** p< 0,001 vs *T. cruzi*. El análisis de varianza fue realizado por ANOVA de una vía y post-test de Tukey. **E.** Fotografías representativas de la localización intracelular de p65 en cada condición experimental por microscopia confocal.

OBJETIVO 4: Determinar la producción y participación de 15-epi-lipoxina-A₄ inducida por simvastatina en células EA.hy926 infectadas por *T. cruzi*.

Entre los efectos pleiotrópicos de las estatinas, se destaca su acción anti-inflamatoria y la producción de un eicosanoide proresolutorio llamado 15 epi-LXA₄ [43,44]. Este eicosanoide podría mediar la disminución de la expresión de ECAMs y consecuente disminución de la adhesión celular. En efecto, simvastatina 5 µM fue capaz de inducir la producción de 15-epi-LXA₄ en células endoteliales. Sin embargo, el incremento fue muy significativo cuando las células fueron infectadas con *T. cruzi* por 16 horas (Figura 11A). Similares resultados se observaron al determinar 15-epi-LXA₄ por espectrometría de masas, usando las mismas condiciones experimentales (Tabla 1) Por otro lado, para determinar la participación de 15-epi-LXA₄ en la disminución de ECAMs, se inhibió competitivamente la actividad de 5-Lipoxigenasa (5-LOX), enzima clave en la generación de 15-epi-LXA₄, con AA-861. Como se observa en la figura 11B, la expresión de ECAMs aumentó con *T. cruzi*, disminuye con simvastatina 5 µM y al inhibir 5-LOX se revirtió el efecto de simvastatina y los niveles de ECAMs alcanza valores similares o mayores al de la infección con *T. cruzi*. Por lo tanto, existe una relación entre el incremento de 15-epi-LXA₄ y la acción de 5-LOX cuando se administra simvastatina.

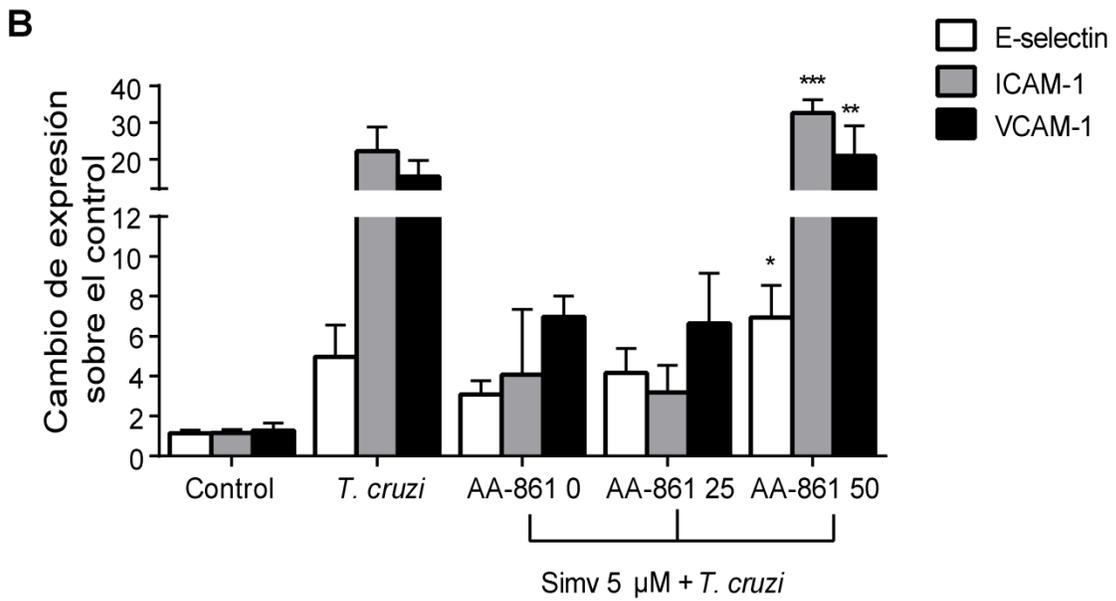
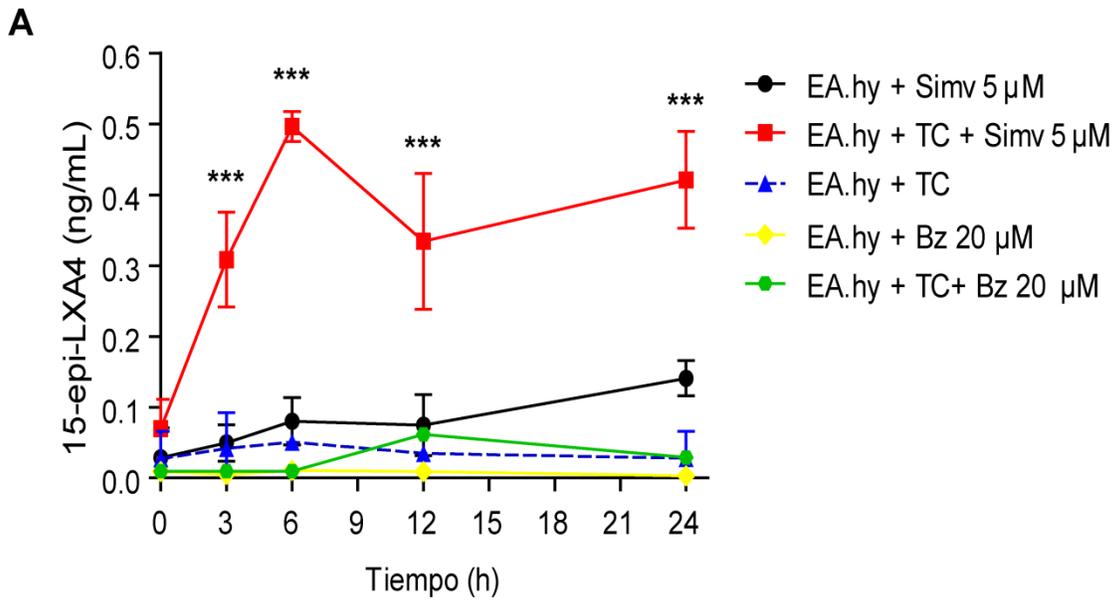


Figura 11. 15-epi-lipoxina-A₄ es inducida por simvastatina y al inhibir su producción el efecto de simvastatina se revierte, aumentando la expresión de ECAMs en células endoteliales infectadas con *Trypanosoma cruzi*. **A.** Células EA.hy926 fueron infectadas con tripomastigotes de *T. cruzi* (Dm28c) en una relación de 1:10 (células: parásitos) durante 16 horas. Después de lavar, las células fueron incubadas con simvastatina 5 µM durante 0, 3, 6, 12 y 24 horas. A cada tiempo se obtuvieron los sobrenadante de cultivo y se determinó los niveles de 15-epi-lipoxina A₄ por un ensayo de ELISA. Los datos fueron expresados como promedio ± DE de tres experimentos independientes. ***p<0,0001 versus el control no infectado (línea negra). El análisis estadístico fue realizado por ANOVA y comparado con el tiempo 0. **B.** Las células EA.hy926 fueron incubadas con simvastatina 5 µM sólo o con 25 y 50 µM de AA-861 (inhibidor competitivo de 5-lipoxigenasa) durante 24 horas. Luego de lavar las células fueron infectadas con tripomastigotes de *T. cruzi* (Dm28c) en una relación de 1:10 (células: parásitos) durante 16 horas. La expresión asociada a la superficie celular se determinó mediante citometría de flujo utilizando anticuerpos monoclonales IgG de ratón conjugado con PE, FITC, y APC, contra E-Selectina, ICAM-1, y VCAM-1 humana, respectivamente. Los datos representan el promedio ± DE de la intensidad media de fluorescencia (MFI) normalizado con el control de isotipo de tres experimentos independientes. El análisis de varianza se realizó por ANOVA de una vía y post-test de Tukey. *p<0,01; *** p<0,001 vs Simv 5µM + *T. cruzi* + AA-861 0 µM.

Tabla 1. Datos MS y cuantificación de cada condición experimental por DSA-TOF MS AxION 2 TOF MS.

Condición Experimental		[M-H]-	m/z calculada	Error (ppm)	Concentración 15-epi-LXA ₄ (ng/mL)
Células EAhy926		351,2171	351,2170	0,3	0,14 ± 0,02
<i>T. cruzi</i>		351,2171	351,2190	-5,4	0,32 ± 0,07
EA.hy926 + <i>T. cruzi</i>		351,2171	351,2183	-3,4	0,5 ± 0,14
EA.hy926 + <i>T. cruzi</i>	simv 3 h.	351,2171	351,2126	12,8	1,58 ± 0,21
EA.hy926 + <i>T. cruzi</i>	simv 6 h.	351,2171	351,2180	-2,6	3,58 ± 1,22
EA.hy926 + <i>T. cruzi</i>	simv 12 h.	351,2171	351,2161	2,8	37,28 ± 11,23
EA.hy926 + <i>T. cruzi</i>	simv 24 h.	351,2171	351,2169	0,6	326,47 ± 34,25

Nota: 15-epi-lipoxina-A₄ fue determinada en los sobrenadantes de cultivos previamente extraídos usando un espectrómetro de masa DSA-TOF. El análisis estadístico fue realizado con ANOVA de una vía y post-test de Tukey. ***p<0,0001 vs EA.hy926 + *T. cruzi*.

OBJETIVO 5: Evaluar el efecto de 15-epi-lipoxina A₄ sobre la señalización de NFκB y la expresión de ECAMs en un modelo de infección endotelial con *T. cruzi*.

Con el objetivo de demostrar la participación de 15-epi-LXA₄ en el efecto encontrado con simvastatina, se incubaron células EA.hy926 con 15-epi-LXA₄ exógena, a diferentes concentraciones previo a la infección con *T. cruzi*. Se observó que 15-epi-LXA₄ es capaz de disminuir la fosforilación de IKK e IκB de manera concentración dependiente (Figura 10A-C). Además, 15-epi-LXA₄ 100 μM, es capaz de detener la migración de p65 hacia el núcleo, encontrándola principalmente en el citosol (Figura 10D). Ambos resultados demuestran que 15-epi-LXA₄ bloquea la activación de la señalización de NFκB, y como se muestra en la Figura 10E, reduce la expresión de ECAMs al igual que simvastatina.

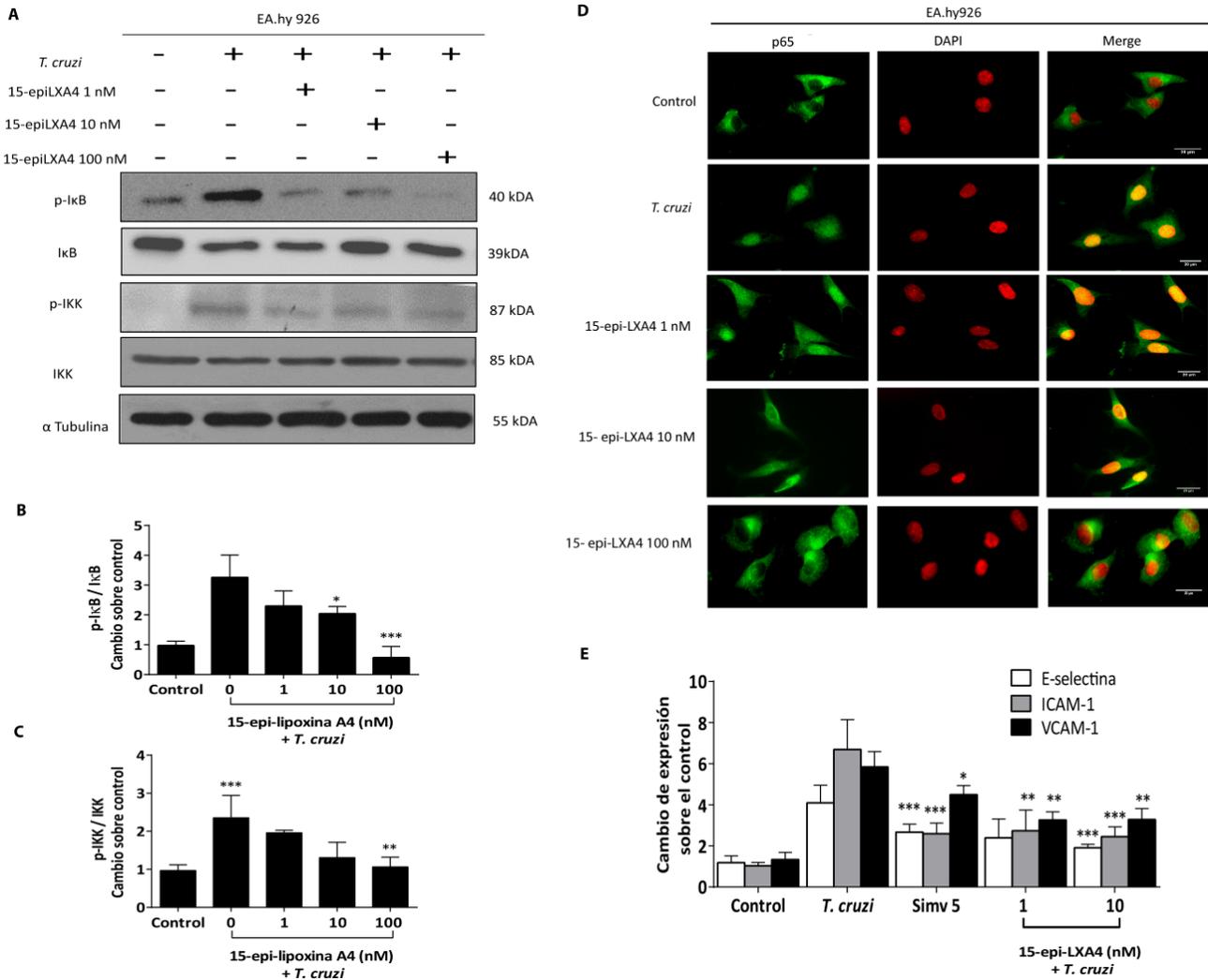


Figura 12. 15-epi-lipoxina A₄ previene el aumento de expresión de ECAMs sobre la superficie de células endoteliales durante la infección con *Trypanosoma cruzi* y bloquea la activación de NFκB. A. Células EA.hy926 fueron incubadas con 15-epi-LXA₄ a las concentraciones indicadas en la figura por 24 horas. Después de lavar, las células fueron estimuladas con tripomastigotes de *T. cruzi* durante 1 hora y se determinó la expresión total de proteína por western blot. **A.** Bandas representativas de IKK, p-IKK, IkB, y p-IkB utilizando α-tubulina como control de carga. **B-C** Cuantificación relativa de la intensidad de banda. Los datos fueron expresados como promedio ± DE de cuatro experimentos independientes. El análisis estadístico se realizó con ANOVA de una vía y post-test de Tukey. * p<0,05; ** p<0,001; *** p<0,001 vs control infectado. **D.** Fotografías representativas de la localización de p65 por microscopia confocal. **E.** Células EA.hy926

fueron incubadas con 15-epi-LXA₄ durante 24 horas y luego fueron infectadas con *T. cruzi* durante 16 horas. Se determinó la expresión de ECAMs por citometría de flujo utilizando anticuerpos monoclonales IgG de ratón conjugado con PE, FITC, y APC, contra E-Selectina, ICAM-1, y VCAM-1 humana, respectivamente. Los datos fueron expresados como promedio ± DE de MFI de tres experimentos independientes. El análisis estadístico se realizó por ANOVA de una vía y post-test de Tukey. *p<0,05; **p<0,01; ***p<0,001 vs *T. cruzi*.

VI. DISCUSIÓN

En la cardiopatía chagásica existe una vasculopatía inflamatoria, en la que participa la expresión sostenida de moléculas de adhesión celular como E-selectina, ICAM-1 y VCAM-1, durante la infección con *T. cruzi*. Con estos resultados (Fig. 4), se demuestra que la presencia del parásito efectivamente aumenta la expresión de ECAMs en la superficie de las células endoteliales a partir de las 16 horas, de manera semejante a lo observado en otros modelos reportados en la literatura, donde LPS o TNF- α son también capaces de aumentar la expresión de ECAMs [57], incluso durante la infección con *T. cruzi* [64]. Sin embargo, la cinética de expresión de ECAMs sobre la superficie celular no ha sido reportada hasta el momento. No obstante, con los resultados presentados acá (Fig. 4), se muestra que esta cinética de expresión puede variar dependiendo del tipo celular utilizado y del tipo de estímulo utilizado. La leve disminución de la expresión a las 72 horas es posible explicarla, ya que entre las 72 y 96 horas de infección *in vitro*, el parásito comienza la transformación de amastigote a tripomastigote para su posterior liberación desde la célula endotelial, esto podría explicar que la expresión de ECAMs disminuya (Fig. 4). Haraldsen y colaboradores [76] demostraron que en células HUVEC estimuladas con TNF α , la expresión máxima de VCAM-1 y E-selectina alcanza el máximo a las 16 horas y ICAM-1 entre 12 y 24 horas, similar a nuestros resultados obtenidos en presencia de *Trypanosoma cruzi*.

Existe suficiente evidencia que demuestra que la simvastatina y otras estatinas tienen efectos antiinflamatorios y que son capaces de disminuir, en células endoteliales, la expresión de E-CAMs inducida por TNF α , LPS o nicotina [58-60]. Sin embargo, el efecto no es uniforme para todas las moléculas de adhesión. Así, en modelos activados con

LPS, la simvastatina disminuye la producción del mRNA de VCAM-1, pero no se ha observado efecto sobre ICAM-1 o E-selectina, los autores sugieren que probablemente porque se usaron concentraciones de LPS muy altas [61]. Igualmente, en células HUVEC estimuladas con LPS, la simvastatina disminuye la expresión en la superficie celular de VCAM-1 y aumenta la de ICAM-1 [62]; sin embargo, no hay una explicación a este fenómeno. De acuerdo a los resultados que se muestran en la figura 5, tanto simvastatina como benznidazol fueron capaces de prevenir el aumento de expresión de las moléculas de adhesión inducidas por la infección con *T. cruzi* de forma similar para E-selectina, ICAM-1 y VCAM-1. Además, este efecto mostró consecuencias funcionales, ya que ambos fármacos también fueron capaces de disminuir la adhesión celular de leucocitos hacia ambas líneas endoteliales humanas (Fig. 9).

Es importante destacar que no existe evidencia previa de la expresión de ECAMs en la superficie endotelial inducida por el parásito, ya que Huang y col., demuestran un aumento de expresión de RNAm pero no logran detectar las moléculas de adhesión en la superficie celular [21]. Sin embargo, en la figura 6 demostramos que el aumento de expresión no es sólo en la superficie sino que también en el contenido total de proteína y que ambos fármacos disminuyen esta expresión total, es decir, no es sólo un efecto de internalización de las ECAMs.

El efecto de simvastatina sobre la adhesión celular era esperable, de acuerdo con reportes previos, donde usaron concentraciones similares a las de los ensayos de esta tesis [59, 63]. Sin embargo, es todavía más sorprendente el hallazgo de que benznidazol por si solo sea capaz de provocar un efecto semejante al de la simvastatina; es decir, la disminución de la adhesión celular como consecuencia de la disminución de ECAMs en

las células endoteliales (Fig. 5, 6 y 9). Además, pudimos demostrar que benznidazol previene la activación endotelial independiente de su actividad tripanocida (Fig. 7-8), este es otro antecedente interesante y no reportado previamente, puesto que nos conduce a pensar en una versatilidad en el mecanismo propuesto para benznidazol o en un efecto adicional independiente de su modo de acción. En todo caso, se ha reportado que el benznidazol podría tener un rol en la modulación de la inflamación [22] a través de la disminución de la actividad de rutas de señalización fundamentales para la inflamación, como NFκB y MAPK, en modelos libres de *T. cruzi* [65,66].

En otros modelos experimentales se reportó la capacidad de ambos fármacos para disminuir la activación de la señalización de NFκB, [64-66]. Pero por primera vez, se aporta evidencia de su capacidad para prevenir la activación endotelial durante una infección con *T. cruzi* a través del bloqueo de la señalización de NFκB como se demuestra en la figura 10. Este es un factor crítico para apoyar la utilidad de este fármaco en el tratamiento durante la fase crónica de la enfermedad de Chagas.

Previamente, reportamos que benznidazol previene el daño endotelial en un modelo murino de Enfermedad de Chagas Crónica [67]. Además, Molina y col. [35, 36] demostraron que el efecto de aspirina a bajas dosis disminuye la mortalidad, parasitemias y daño cardíaco. Interesantemente, aspirina fue capaz de producir, sólo a bajas dosis, 15-epi-LXA₄. Los autores demuestran la primera evidencia de la participación de este lípido proresolutorio de la inflamación en un modelo experimental de enfermedad de Chagas. Sin embargo, los efectos de simvastatina en un modelo de activación endotelial aún no han sido estudiados.

De acuerdo con nuestros resultados (Fig.11; Tabla 1), el efecto de simvastatina sobre la cascada de señalización, expresión de moléculas de adhesión y finalmente sobre la adhesión celular, ocurre a través de la generación de 15-epi-lipoxina A₄, ya que simvastatina fue capaz de generar este eicosanoide durante la infección con *T. cruzi* y al inhibir la 5-lipoxigenasa, enzima clave en la síntesis de 15-epi-lipoxina A₄ el efecto de simvastatina se revierte (Fig. 11B). Sin embargo, benznidazol no indujo la producción de 15-epi-lipoxina A₄, y, por lo tanto, el mecanismo de inhibición de la vía de IKK- IκB y p65 por el benznidazol podría deberse a otro mecanismo, aún desconocido (Fig. 11A).

Finalmente en la figura 12 demostramos que 15-epi-lipoxina A₄ fue capaz de bloquear la activación de NFκB, disminuir la migración de p65 hacia la región nuclear de las células endoteliales y prevenir la expresión de ECAMs inducida por el parásito, de la misma manera como lo hizo simvastatina. El rol de los lípidos proresolutorios en la inflamación inducida por *T. cruzi* está adquiriendo cada vez más importancia para entender el progreso de la miocardiopatía chagásica [68, 69]. En efecto, el rol de LTB₄ y PAF, generados por los macrófagos ha sido relacionado con el control de la parasitemia en modelos *in vivo* de enfermedad de Chagas [44,71-73]. El LTB₄ es dependiente de la actividad de 5-Lipoxigenasa, y está implicado en la disminución de la inflamación, la deposición de colágeno y la migración de los linfocitos al miocardio. Además, los derivados de 5-LO se asocian cada vez más con la resolución de los procesos inflamatorios agudos [71-73]. Por lo tanto, estos agentes podrían estar más involucrados en la fase aguda de la enfermedad de Chagas. Sin embargo, en un modelo crónico de cardiopatía Chagásica, la simvastatina demostró capacidad para disminuir la inflamación. Probablemente, simvastatina, a través de la producción de 15-epi-LXA₄, impidió la

migración de leucocitos en el miocardio por la disminución de la activación endotelial [63,74].

Considerando que simvastatina o benznidazol mostraron similares efectos sobre la expresión de ECAMs, adhesión celular y bloqueo de NFκB, evaluamos el efecto de la combinación de ambos fármacos en concentraciones crecientes. Desafortunadamente, la combinación resultó ser antagónica para E-selectina y VCAM-1 y se observó una tendencia aditiva en el caso de ICAM-1. Es probable que compartan sitios de unión, que actúen sobre el mismo blanco celular o como muestran nuestros experimentos inactivan la misma ruta de señalización, y esto impide observar un efecto sinérgico o aditivo. Consideramos que es importante evaluar la combinación en un modelo *in vivo* e investigar en una ruta de señalización común el mecanismo que comparten.

En nuestro modelo se utilizó la incubación de los tratamientos previo a la infección, apuntando no a la prevención de la infección inicial del individuo sino que considerando que en un modelo clínico real la infección está establecida, pero no todas las células se encuentran infectadas a la vez, ya que primero debe ocurrir el ciclo biológico del parásito, es decir, el parásito infecta células nucleadas, luego se replica al interior de la células en forma de amastigote y finalmente se liberan desde la célula como tripomastigotes para infectar otra célula nucleada y segundo un individuo infectado crónicamente puede permanecer durante años en estado indeterminado, es decir con serología positiva sin manifestaciones clínicas de la enfermedad pero existe reactivación por inmunosupresión u otros mecanismos que pueden determinar el desarrollo de las manifestaciones clínicas o estado determinado de la enfermedad [34]. Por lo que, en un paciente crónico el objetivo terapéutico es controlar la carga parasitaria y prevenir el desarrollo de la cardiopatía

chagásica crónica o alteraciones digestivas. Frente a este escenario demostrar que el pretratamiento farmacológico previene la activación endotelial es crucial en el paciente crónico.

Creemos que es esencial verificar esta hipótesis con futuros estudios *in vivo*, utilizando un modelo de Cardiopatía Chagásica Crónica y considerar el rol inmunomodulador y antiinflamatorio de benznidazol en el progreso de la Cardiopatía Chagásica.

CONCLUSIÓN

Simvastatina o benznidazol, previenen la activación endotelial a través, de la disminución de expresión de E-selectina, ICAM-1 y VCAM-1 y la disminución de la adhesión celular en un modelo de activación endotelial inducido por *T. cruzi*. Además, ambos fármacos bloquean la señalización de NFκB, teniendo un rol importante en la modulación de la respuesta inflamatoria. Por otro lado, el efecto de simvastatina estaría mediado por la producción de 15-epi-LXA₄.

Por lo tanto, simvastatina puede jugar un rol pivotal en el esquema terapéutico de la enfermedad de Chagas, generando una modulación de la respuesta del hospedero frente al parásito evitando la progresión de la enfermedad.

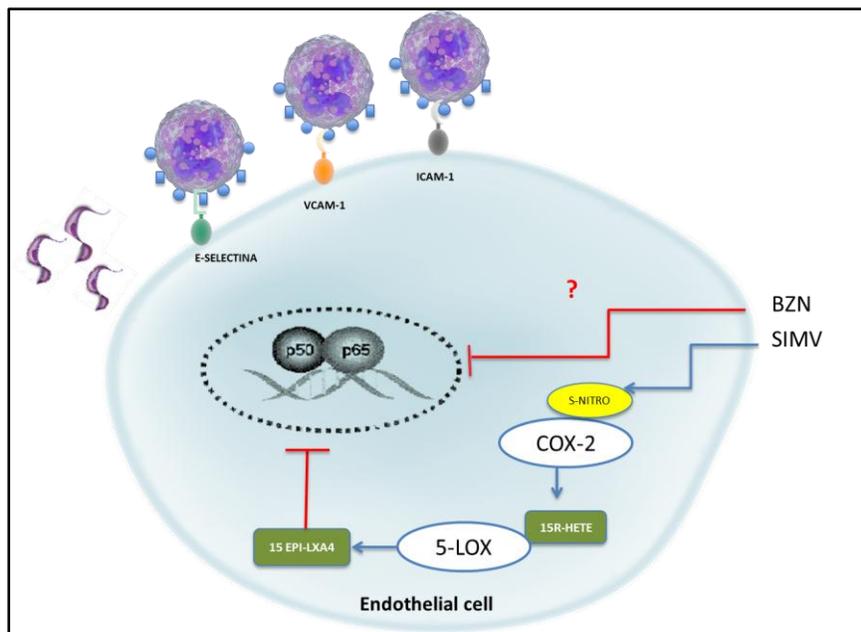


Figura 13. Simvastatina y benznidazol previenen la activación endotelial en la infección con *Trypanosoma cruzi*, a través de la disminución de expresión de ECAMs y la disminución de la adhesión celular.

REFERENCIAS

1. Rassi A Jr, Rassi A, Marcondes de Rezende J. (2012). American trypanosomiasis (Chagas disease). *Infect. Dis. Clin. North Am.* 26(2): 275-291.
2. WHO. Working to overcome the global impact of neglected tropical diseases: first WHO report on neglected tropical diseases : update 2011. World Health Organization: Geneva, 2011.
3. Schmunis GA. (2007). Epidemiology of Chagas disease in non-endemic countries: the role of international migration. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 102 Suppl 1: 75-85.
4. Bern C, Montgomery SP. (2009). An estimate of the burden of Chagas disease in the United States. *Clin Infect Dis* 49:52-54.
5. Gascon J, Bern C, Pinazo MJ. (2010). Chagas disease in Spain, the United States and other non-endemic countries. *Acta Trop* 115: 22-27.
6. Hotez PJ, Dumonteil E, Woc-Colburn L, Serpa JA, Bezek S, Edwards MS., Hallmark CJ, Musselwhite LW, Flink BJ, Bottazzi ME. (2012). Chagas Disease: "The New HIV/AIDS of the Americas". *PLoS Negl Trop Dis* 6: 1498.
7. Machado FS, Jelicks LA, Kirchhoff LV, Shirani J, Nagajyothi F, Mukherjee S, Nelson R, Coyle CM, Spray DC, de Carvalho AC, Guan F, Prado CM, Lisanti MP, Weiss LM, Montgomery SP, Tanowitz HB, (2012). Chagas heart disease: report on recent developments. *Cardiol Rev* 20, 53-65.
8. Rassi a Jr, Rassi A, Marin-Neto JA. (2009). Chagas heart disease: pathophysiologic mechanism, prognostic, factors and risk stratification. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 104 Suppl 1, 152-158.
9. Coura JR. (2007). Chagas disease: what is known and what is needed- background article. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 102 Suppl 1, 113-122.
10. Abrahamsohn IA, Coffman RL. (1996). *Trypanosoma cruzi*: IL-10, TNF, IFN-gamma, and IL-12 regulate innate and acquired immunity to infection. *Exp Parasitol* 84, 231-244.
11. Almeida-Leite CM, Galvao LM, Afonso LC, Cunha FQ, Arantes RM. (2007). Interferon-gamma induced nitric oxide mediates in vitro neuronal damage by *Trypanosoma cruzi*-infected macrophages. *Neurobiol Dis* 25, 170-178.

12. Sathler-Avelar R, Vitelli-Avelar DM, Teixeira-Carvalho A, Martins-Filho OA. (2009). Innate immunity and regulatory T-cells in human Chagas disease: what must be understood? *Mem Inst Oswaldo Cruz* 104 Suppl 1, 246-251.
13. Freire-de-Lima CG, Nascimento DO, Soares MB, Bozza PT, Castro-Faria-Neto HC, de Mello FG, DosReis GA, Lopes MF. (2000). Uptake of apoptotic cells drives the growth of a pathogenic trypanosome in macrophages. *Nature* 403, 199-203.
14. Munoz-Saravia SG, Haberman A, Wallukat G, Schimke I. (2012). Chronic Chagas' heart disease: a disease on its way to becoming a worldwide health problem: epidemiology, etiopathology, treatment, pathogenesis and laboratory medicine. *Heart Fail Rev* 17, 45-64.
15. Marin-Neto JA, Cunha-Neto E, Maciel BC, Simoes MV. (2007). Pathogenesis of chronic Chagas heart disease. *Circulation* 115, 1109-1123.
16. Rossi M, Goncalves S, Ribeiro-dos-Santos R. (1984). Experimental *Trypanosoma cruzi* cardiomyopathy in BALB/c mice. The potential role of intravascular platelet aggregation in its genesis. *Am J Pathol* 114, 209-216.
17. Rossi MA, Carobrez SG. (1985). Experimental *Trypanosoma cruzi* cardiomyopathy in BALB/c mice: histochemical evidence of hypoxic changes in the myocardium. *Br J Exp Pathol* 66, 155-160.
18. Rossi MA, Tanowitz HB, Malvestio LM, Celes MR, Campos EC, Blefari V, Prado CM, (2010). Coronary microvascular disease in chronic Chagas cardiomyopathy including an overview on history, pathology, and other proposed pathogenic mechanisms. *PLoS Negl Trop Dis* 4.
19. Prado CM, Jelicks LA, Weiss LM, Factor SM, Tanowitz HB, Rossi MA. (2011). The vasculature in chagas disease. *Adv Parasitol* 76, 83-99.
20. Videm V y Albrigtsen M. (2007). Soluble ICAM-1 and VCAM-1 as Markers of Endothelial Activation. *Scandinavian Journal of Immunology* 67: 523–53.
21. Huang H, Calderon TM, Berman JW, Braunstein VL, Weiss LM, Wittner M, Tanowitz HB. (1999). Infection of endothelial cells with *Trypanosoma cruzi* activates NF-kappaB and induces vascular adhesion molecule expression. *Infect Immun* 67, 5434-5444.
22. Manarin R, Pascutti MF, Ruffino JP, De Las Heras B, Bosca L, Bottasso O, Revelli S, Serra E. (2010). Benznidazole blocks NF-kappaB activation but not AP-1 through inhibition of IKK. *Mol Immunol* 47, 2485-2491.

23. Pierce JW, Schoenleber R, Jesmok G, Best J, Moore SA, Collins T, Gerritsen ME. (1997). Novel inhibitors of cytokine-induced I κ B phosphorylation and endothelial cell adhesion molecule expression show anti-inflammatory effects in vivo. *J Biol Chem* 272, 21096-21103.
24. Kawai T, Akira S. (2007). Signaling to NF- κ B by Toll-like receptors. *Trends Mol Med* 13, 460-469.
25. Chen Z, Hagler J, Palombella VJ, Melandri F, Scherer D, Ballard D, Maniatis T. (1995). Signal-induced site-specific phosphorylation targets I κ B to the ubiquitin-proteasome pathway. *Genes Dev* 9, 1586-1597.
26. Karin M, Ben-Neriah Y. (2000). Phosphorylation meets ubiquitination: the control of NF- κ B activity. *Annu Rev Immunol* 18, 621-663.
27. Pinto AM, Sales PC, Camargos ER, Silva AM. (2011). Tumour necrosis factor (TNF)-mediated NF- κ B activation facilitates cellular invasion of non-professional phagocytic epithelial cell lines by *Trypanosoma cruzi*. *Cell Microbiol* 13, 1518-1529.
28. Liu SF, Malik AB. (2006). NF- κ B activation as a pathological mechanism of septic shock and inflammation. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 290, L622-L645
29. Terry RW, Kwee L, Levine JF, Labow MA. (1993). Cytokine induction of an alternatively spliced murine vascular cell adhesion molecule (VCAM) mRNA encoding a glycosylphosphatidylinositol-anchored VCAM protein. *Proc Natl Acad Sci U S A* 90, 5919-5923.
30. Laucella S, De Titto EH, Segura EL, Orn A, Rottenberg ME. (1996). Soluble cell adhesion molecules in human Chagas' disease: association with disease severity and stage of infection. *Am J Trop Med Hyg* 55, 629-634.
31. Hall BS, Bot C, Wilkinson SR. (2011). Nifurtimox activation by trypanosomal type I nitroreductases generates cytotoxic nitrile metabolites. *J Biol Chem* 286, 13088-13095.
32. Hall BS, Wilkinson SR. (2012). Activation of benznidazole by trypanosomal type I nitroreductases results in glyoxal formation. *Antimicrob Agents Chemother* 56, 115-123.
33. Apt W. (2010). Current and developing therapeutic agents in the treatment of Chagas disease. *Drug Des Devel Ther* 4, 243-253.

34. Coura JR. (2009). Present situation and new strategies for Chagas disease chemotherapy – a proposal. *Mem Inst Oswaldo Cruz*. 104(4): 549-554.
35. Molina-Berrios A, Campos-Estrada C, Lapier M, Duaso J, et al. (2013) Protection of vascular endothelium by aspirin in a murine model of chronic Chagas' disease. *Parasitol Res* 112(7): 2731-9.
36. Molina-Berrios A, Campos-Estrada C, Henriquez N, Faundez M, Torres G, et al. (2013) Protective role of acetylsalicylic acid in experimental *Trypanosoma cruzi* infection: evidence of a 15-epi-lipoxin A(4)-mediated effect. *PLoS Negl Trop Dis* 7: e2173.
37. Lee YM, Chen WF, Chou DS, Jayakumar T, Hou SY, Lee JJ, Hsiao G, Sheu JR. (2010). Cyclic nucleotides and mitogen-activated protein kinases: regulation of simvastatin in platelet activation. *J Biomed Sci* 17: 45.
38. Liu M, Wang F, Wang Y, Jin R. (2009). Atorvastatin improves endothelial function and cardiac performance in patients with dilated cardiomyopathy: the role of inflammation. *Cardiovasc Drugs Ther* 23, 369-376.
39. Brands MW, Hildebrandt DA, Mizelle HL, Hall JE. (1991). Sustained hyperinsulinemia increases arterial pressure in conscious rats. *Am J Physiol* 260: R764-768.
40. Stach K, Nguyen XD, Lang S, Elmas E, Weiss C, Borggreffe M, Fischer J, Kalsch T. (2012). Simvastatin and atorvastatin attenuate VCAM-1 and uPAR expression on human endothelial cells and platelet surface expression of CD40 ligand. *Cardiol J* 19, 20-28.
41. Yang JC, Huang F, Wu CJ, Chen YC, Lu TH, Hsieh CH. (2012). Simvastatin reduces VCAM-1 expression in human umbilical vein endothelial cells exposed to lipopolysaccharide. *Inflamm Res* 61,485-491
42. Atar S, Ye Y, Lin Y, Freeberg SY, Nishi SP, Rosanio S, Huang MH, Uretsky BF, Perez-Polo JR, Birnbaum Y. (2006). Atorvastatin-induced cardioprotection is mediated by increasing inducible nitric oxide synthase and consequent S-nitrosylation of cyclooxygenase-2. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 290, H1960-1968.
43. Birnbaum Y, Ye Y. (2012). Pleiotropic effects of statins: the role of eicosanoid production. *Curr Atheroscler Rep* 14, 135-139.

44. Serhan CN. (2005). Lipoxins and aspirin-triggered 15-epi-lipoxins are the first lipid mediators of endogenous anti-inflammation and resolution. *Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids* 73: 141–162.
45. Wang YP, Wu Y, Li LY, Zheng J, Liu RG, Zhou JP, Yuan SY, Shang Y, Yao SL. (2011)e. Aspirin-triggered lipoxin A4 attenuates LPS-induced pro-inflammatory responses by inhibiting activation of NF-kappaB and MAPKs in BV-2 microglial cells. *J Neuroinflammation* 8, 95.
46. Manarin R, Pascutti MF, Ruffino JP, De Las Heras B, Bosca L, Bottasso O, Revelli, S., Serra, E. (2010). Benznidazole blocks NF-kappaB activation but not AP-1 through inhibition of IKK. *Mol Immunol* 47, 2485-2491.
47. Florin-Christensen M, Florin-Christensen J, Garin C, Isola E, Brenner RR, Rasmussen L 1990. Inhibition of *Trypanosoma cruzi* growth and sterol biosynthesis by lovastatin. *Biochem Biophys Res Commun* 166: 1441-1445.
48. Urbina JA, Lazard K, Marchan E, Visbal G, Aguirre T, Piras MM, Piras R, Maldonado RA, Payares G, de Souza W. (1993). Mevinolin (lovastatin) potentiates the antiproliferative effects of ketoconazole and terbinafine against *Trypanosoma* (*Schizotrypanum*) *cruzi*: in vitro and in vivo studies. *Antimicrob Agents Chemother* 37: 580-591.
49. Urbina JA. (2009). Ergosterol biosynthesis and drug development for Chagas disease. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 104 (Suppl.I): 311-318.
50. Priotto S, Sartori MJ, Repposi G, Valentich MA. (2009). *Trypanosoma cruzi*: participation of cholesterol and placental alkaline phosphatase in the host cell invasion. *Exp Parasitol* 122: 70-73.
51. Hernandez-Presa MA, Ortego M, Tunon J, Martin-Ventura JL, Mas S, Blanco-Colio LM, Aparicio C, Ortega L, Gomez-Gerique J, Vivanco F, Egido J. (2003). Simvastatin reduces NF-kappaB activity in peripheral mononuclear and in plaque cells of rabbit atheroma more markedly than lipid lowering diet. *Cardiovasc Res* 57, 168-177.
52. Melo L, Caldas IS, Azevedo MA, Goncalves KR, da Silva do Nascimento AF, Figueiredo VP, de Figueiredo Diniz L, de Lima WG, Torres RM, Bahia MT, Talvani A. (2011). Low doses of simvastatin therapy ameliorate cardiac inflammatory remodeling in *Trypanosoma cruzi*-infected dogs. *Am J Trop Med Hyg* 84, 325-331.
53. Silva R, Shrestha-Bajracharya D, Almeida-Leite CM, Leite R, Bahia MT, Talvani A. (2012). Short-term therapy with simvastatin reduces inflammatory mediators and

heart inflammation during the acute phase of experimental Chagas disease. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 107 (4) 513-521.

54. Mosmann T. (1983). Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. *J. Immunol. Methods* 65, (1-2), 55-63.
55. Lowry OH, Rosebrough NJ, Farr AL, Randall RJ. Protein measurement with the Folin phenol reagent. (1951). *J Biol Chem.*193(1):265-75.
56. Tong S, Neboori HJ, Tran ED, Schmid-Schonbein GW. (2011) Constitutive expression and enzymatic cleavage of ICAM-1 in the spontaneously hypertensive rat. *J. Vasc. Res* 48, (5), 386-396.
57. Norata GD, Tibolla G, Seccomandi PM, Poletti A, Catapano AL. (2006) Dihydrotestosterone decreases tumor necrosis factor-alpha and lipopolysaccharide-induced inflammatory response in human endothelial cells. *J. Clin. Endocrinol. Metab* 91, (2), 546-554.
58. Landsberger M, Wolff B, Jantzen F, Rosenstengel C, Vogelgesang D, Staudt A, Dahm JB, Felix SB. (2007). Cerivastatin reduces cytokine-induced surface expression of ICAM-1 via increased shedding in human endothelial cells. *Atherosclerosis* 190; 43–52.
59. Zapolska-Downar D, Siennicka A, Kaczmarczyk A, Kołodziej B, Naruszewicz M. (2004). Simvastatin modulates TNF α -induced adhesion molecules expression in human endothelial cells. *Life Science* 75; 1287–1302.
60. Cirillo P, Pacileo M, De Rosa S, Calabro P, Gargiulo A, Angri V, Prevete N, Fiorentino I, Ucci G, Sasso L, Petrillo G, Musto D'Amore S, Chiariello M. (2007). HMG-CoA reductase inhibitors reduce nicotine-induced expression of cellular adhesion molecules in cultured human coronary endothelial cells. *J Vasc Res* 44:460–470.
61. Yang JC, Huang F, Wu CJ, Chen YC, Lu TH, Hsieh CH. (2012). Simvastatin reduces VCAM-1 expression in human umbilical vein endothelial cells exposed to lipopolysaccharide. *Inflamm Res* 61,485-491.
62. Stach K, Nguyen XD, Lang S, Elmas E, Weiss C, Borggrefe M, Fischer J, Kalsch T. (2012). Simvastatin and atorvastatin attenuate VCAM-1 and uPAR expression on human endothelial cells and platelet surface expression of CD40 ligand. *Cardiol J* 19, 20-28.

63. Eccles KA, Sowden H, Porter KE, Parkin SM, Homer-Vanniasinkam S.,Graham AM. (2008). Simvastatin alters human endothelial cell adhesion molecule expression and inhibits leukocyte adhesion under flow. *Atherosclerosis* 200(1):69-79.
64. Dias WB, Fajardo FD, Graca-Souza AV, Freire-de-Lima L, Vieira F, Girard MF, Bouteille B, Previato JO, Mendonca-Previato L, Todeschini AR. (2008)Endothelial cell signalling induced by trans-sialidase from *Trypanosoma cruzi*. *Cell. Microbiol* 10, (1), 88-99.
65. Cutrullis RA, Moscatelli GF, Moroni S, Volta BJ, Cardoni RL, Altcheh JM, Corral RS, Freilij HL, Petray PB. (2011) Benznidazole therapy modulates interferon-gamma and M2 muscarinic receptor autoantibody responses in *Trypanosoma cruzi*-infected children. *PLoS One* 6, (10), e27133.
66. Ronco MT, Manarin R Frances D, Serra E, Revelli S, Carnovale C. (2011). Benznidazole treatment attenuates liver NF-kappaB activity and MAPK in a cecal ligation and puncture model of sepsis. *Mol. Immunol* 48, (6-7), 867-873.
67. Molina-Berrios A, Campos-Estrada C, Lapier M, Duaso J, Kemmerling U, Galanti, N, Leiva M, Ferreira J, Lopez-Munoz R, Maya JD. (2013) Benznidazole prevents endothelial damage in an experimental model of Chagas disease. *Acta Trop* 127, (1), 6-13.
68. Pavanelli WR, Gutierrez FR, Mariano FS, Prado CM, Ferreira BR, Teixeira MM, Canetti C, Rossi MA, Cunha FQ, Silva JS. (2010). 5-lipoxygenase is a key determinant of acute myocardial inflammation and mortality during *Trypanosoma cruzi* infection. *Microbes Infect* 12, (8-9), 587-597.
69. Machado FS, Dutra WO, Esper L, Gollob KJ, Teixeira MM, Factor SM, Weiss LM, Nagajyothi F, Tanowitz HB, Garg NJ. (2012). Current understanding of immunity to *Trypanosoma cruzi* infection and pathogenesis of Chagas disease. *Semin. Immunopathol* 34, (6), 753-770.
70. Talvani A, Teixeira MM. (2011). Inflammation and Chagas disease some mechanisms and relevance. *Adv. Parasitol* 76, 171-194.
71. Buckley CD, Gilroy DW, Serhan CN. (2014). Proresolving lipid mediators and mechanisms in the resolution of acute inflammation. *Immunity* 40, (3), 315-327.
72. Chinthamani S, Odusanwo O, Mondal N, Nelson J, Neelamegham S, Baker OJ. (2012). Lipoxin A4 inhibits immune cell binding to salivary epithelium and vascular endothelium. *Am. J. Physiol. Cell Physiol* 302, (7), C968-978.

73. Machado FS, Mukherjee, S Weiss, LM, Tanowitz, HB, Ashton AW. (2011), Bioactive lipids in Trypanosoma cruzi infection. *Adv. Parasitol.* 76, 1-31.
74. Filep JG, Zouki C, Petasis NA, Hachicha M, Serhan CN. (2002). Lipoxin A4 and aspirin-triggered 15-epi-lipoxin A4 modulate adhesion molecule expression on human leukocytes in whole blood and inhibit neutrophil-endothelial cell adhesion. *Adv Exp Med Biol* 507:223-8.
75. Haraldsen G, Kvale D, Lien B, Farstad IN, Brandtzaeg P. (1996). Cytokineregulated expression of E-selectin, intercellular adhesion molecule-1 (ICAM-1), and vascular cell adhesion molecule-1 (VCAM-1) in human intestinal endothelial cells. *J Immunol.*156:2558–2565.

ANEXOS

Tabla 2. Simvastatina y benznidazol no alteran la viabilidad celular a las concentraciones en las que se enmarca la evaluación de la expresión de moléculas de adhesión.

	EA.hy926	HUVEC	HL-60	Trypomastigote Dm28c
simvastatina	65,36 ± 1,02	80,42 ± 1,56	67,95 ± 1,11	4,2 ± 1,06
benznidazol	>100	>100	>100	20,8 ± 1.35

*Datos son presentados como promedio de IC₅₀ (μM) ± DE n= 3 experimentos independientes por MTT.

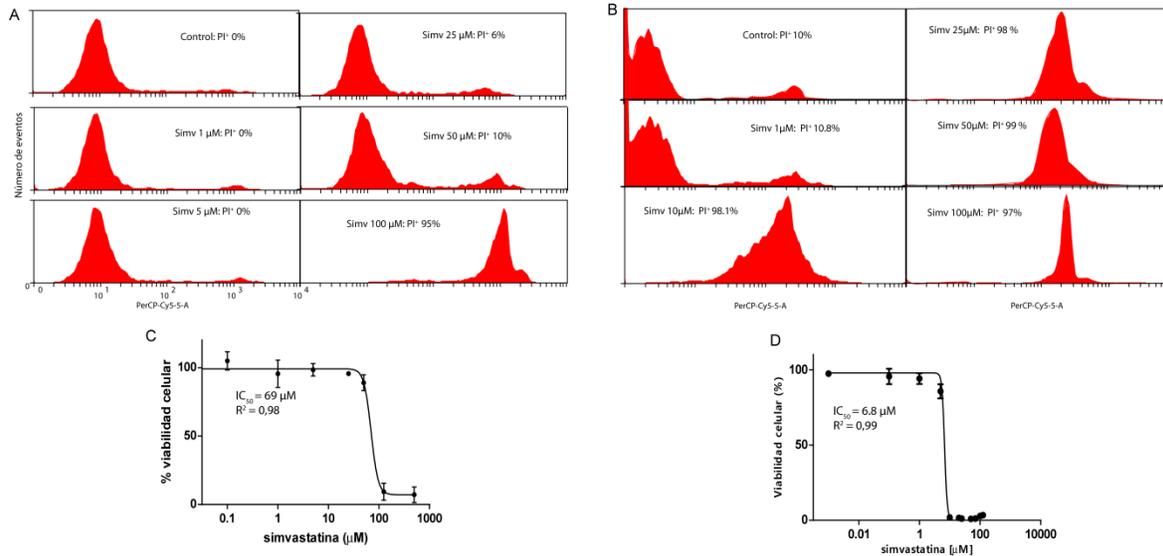


Figura suplementaria 1. Efecto de simvastatina sobre la viabilidad de células EAhy926 y tripomastigotes Dm28c. Se evaluó la incorporación de yoduro de propidio (PI) por citometría de flujo en células EA.hy926 semiconfluentes que fueron incubadas con concentraciones crecientes de simvastatina durante 24 horas. **A.** Histogramas que representan el porcentaje de células que resultaron PI+. **B.** Histogramas que representan el porcentaje de parásitos que resultaron PI+. **C-D.** Análisis de los histogramas representados en una curva concentración-respuesta, de los cuáles se obtuvo el IC₅₀ de simvastatina en células y parásitos.

Figura suplementaria 2. Simvastatina no altera la integridad de citoesqueleto a las concentraciones en las que se enmarca la evaluación de la expresión de moléculas de adhesión.

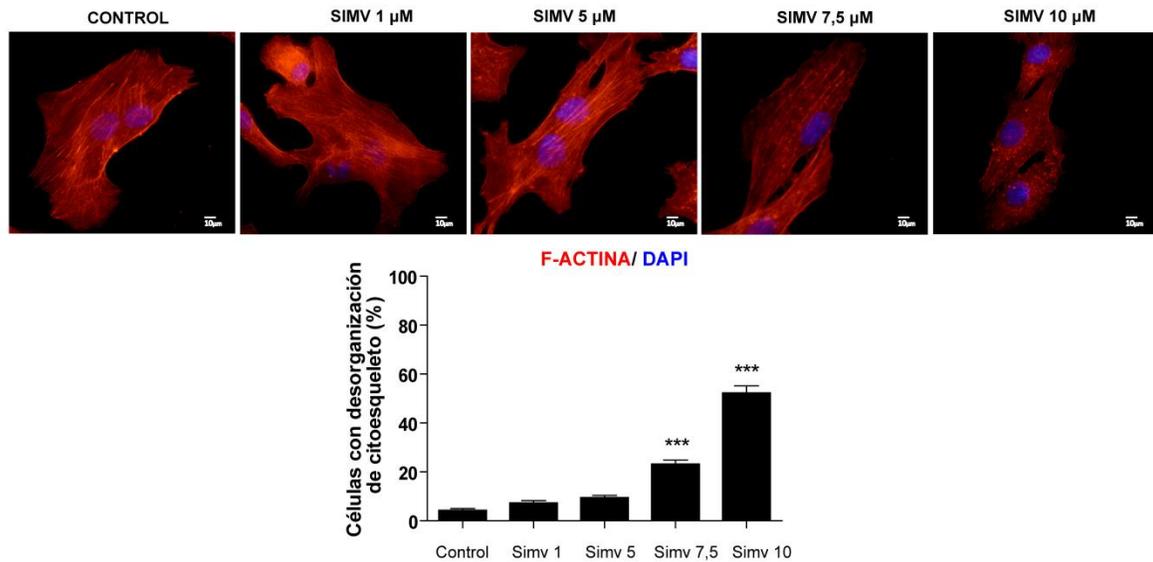


Figura Suplementaria 2. Efecto de simvastatina sobre la organización del citoesqueleto. Células EA.hy926 fueron tratadas con concentraciones de simvastatina 1, 5, 7,5 y 10 μM durante 24 horas. **A.** Las células fueron fijadas, permeabilizadas e incubadas con Rodamina-Faloidina para visualizar la organización del citoesqueleto por microscopia de fluorescencia. **B.** La gráfica representa el porcentaje de células con desorganización del citoesqueleto. Los datos fueron expresados como promedio \pm SEM de 3 experimentos independientes. *** $p < 0,001$ vs control.

Figura suplementaria 3. Efecto de simvastatina y benznidazol sobre la expresión de ECAMs a concentraciones crecientes en células EA.hy926 infectadas con *T. cruzi*.

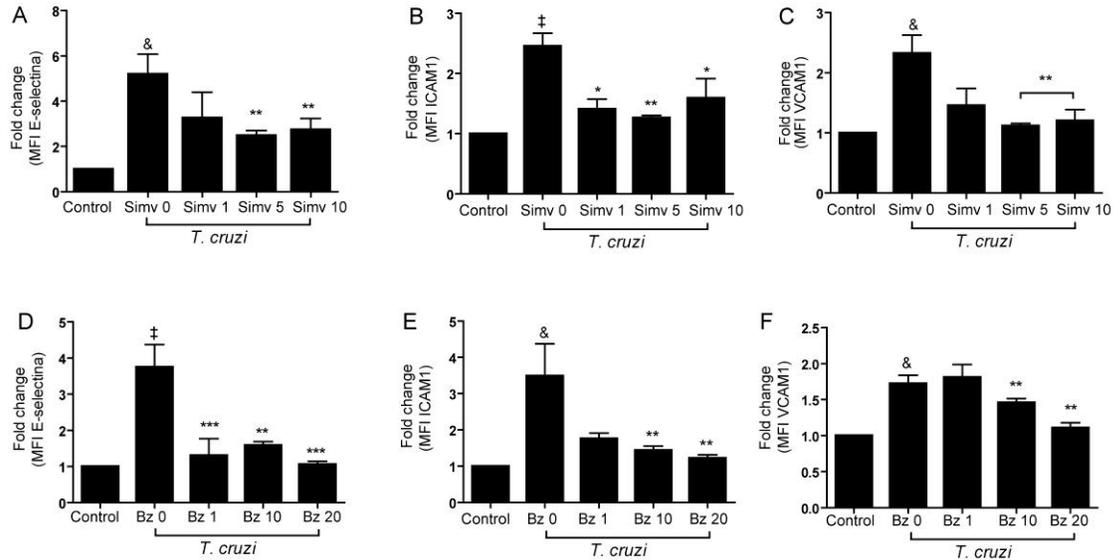


Figura suplementaria 3. Simvastatina y benznidazol previenen la expresión de moléculas de adhesión celular en células tipo endotelial (EA.hy926) durante la infección inicial con *T. cruzi*. Células EA.hy926 fueron incubadas con simvastatina 1, 5 y 10 μ M por 24 horas (A-C) y benznidazol 1,10 y 20 μ M por 24 horas (D-F). Luego, las células fueron lavadas e incubadas con tripomastigotes de la cepa Dm28c (*T. cruzi*) en una relación célula/parásito 1:10, o sólo en medio de cultivo (control) por 16 horas. Se evaluó la expresión en la superficie celular de **A, D.** E-selectina, **B, E.** ICAM-1 y **C, F.** VCAM1 por citometría de flujo. Cada grupo fue comparado con el control de isotipo IgG₁ e IgG_{2A} y se normalizó con respecto al control. Los datos son expresados promedio \pm SEM de 4 experimentos independientes. El análisis estadístico fue realizado con ANOVA de una vía y post-test de Tukey. *** p < 0,001; ** p < 0,01; * p < 0,05 vs simv 0 o Bz 0, † p < 0,001; & p < 0,01 vs control.

