

**UNIVERSIDAD DE CHILE**  
**FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS Y**  
**FARMACÉUTICAS**



**SIMVASTATINA INDUCE LA REPARACIÓN CARDÍACA**  
**A TRAVÉS DE LA ACTIVACIÓN DE LA VÍA DE NOTCH 1**  
**EN LA CARDIOMIOPATÍA CHAGÁSICA CRÓNICA**

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

***DANIELA INÉS GUZMÁN RIVERA***

**Director de Tesis: Dr. Juan Diego Maya Arango**

**Dra. Bárbara Pesce Reyes**

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

**Santiago-CHILE**

**Mayo 2020**

# **UNIVERSIDAD DE CHILE**

## **FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS Y FARMACÉUTICAS**

### **INFORME DE APROBACIÓN DE TESIS DE DOCTORADO**

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

## **DANIELA INÉS GUZMÁN RIVERA**

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

---

**Director de Tesis:**

**Dra. Juan Diego Maya** \_\_\_\_\_

**Co-director de Tesis:**

**Dra. Bárbara Pesce** \_\_\_\_\_

**Comisión Evaluadora de Tesis:**

**Dr. Guillermo Díaz**

---

**Dra. Raúl Vivar**

---

**Dr. Mauricio Boric**

---

**Dr. Ramón Rodrigo**

---

## **AGRADECIMIENTOS**

*Esta tesis está dedicada a mis padres Aurelina y Daniel por su amor, su gran apoyo en las buenas y en las malas y comprensión durante toda mi vida para superar los distintos desafíos.*

*Quiero agradecer a mi familia, mi prima Sofía y a mis amistades, especialmente a Fabiola, Ileana, Michel, Anita, Christian, Helena, Félix y Sebastián por estar presentes en los buenos momentos, pero especialmente en los más difíciles y que me ayudaron a seguir adelante.*

*A mis profesores Juan Diego Maya y Bárbara Pesce por aceptarme en el laboratorio orientarme y enseñarme en este largo camino.*

*A todos del Laboratorio de Bioquímica, Metabolismo y Resistencia a Fármacos, del Programa de Farmacología Molecular y Clínica, Facultad de Medicina, Universidad de Chile.*

## **FINANCIAMIENTO**

La presente Memoria contó con el apoyo financiero del Proyecto FONDECYT Regular N°1170126, CONICYT 21151001 y REDES 170126l Proyecto FONDECYT N° 1110176. Se realizó en el Instituto de Ciencias Biomédicas, Programa de Farmacología Molecular y Clínica, Facultad de Medicina, Universidad de Chile.

## ÍNDICE GENERAL

<b>RESUMEN</b> .....	<b>9</b>
<b>SUMMARY</b> .....	<b>11</b>
<b>INTRODUCCIÓN</b> .....	<b>13</b>
ASPECTOS GENERALES DE LA ENFERMEDAD DE CHAGAS .....	13
EVOLUCIÓN CLINICO-PATOLÓGICA DE LA ENFERMEDAD DE CHAGAS .....	13
FISIOPATOLOGÍA DE LA ENFERMEDAD DE CHAGAS.....	15
TRATAMIENTO FARMACOLÓGICO DE LA ENFERMEDAD DE CHAGAS.....	17
ESTATINAS EN EL CONTEXTO DE LA CARDIOPATIA CHAGÁSICA CRÓNICA .....	19
VÍA DE SEÑALIZACIÓN DE NOTCH 1 .....	20
<b>HIPÓTESIS</b> .....	<b>24</b>
<b>OBJETIVOS</b> .....	<b>25</b>
OBJETIVO GENERAL.....	25
OBJETIVOS ESPECÍFICOS .....	25
<b>MATERIALES Y MÉTODOS</b> .....	<b>26</b>
CULTIVOS CELULARES.....	26
ANIMALES.....	26
INFECCIÓN CON <i>T. CRUZI</i> .....	26
ESQUEMA DE TRATAMIENTO EN CÉLULAS HUVEC.....	27
CITOMETRÍA DE FLUJO.....	27
WESTERN BLOT .....	28
ENSAYO DE FORMACIÓN DE TUBO .....	29
ENSAYO DE RT-QPCR .....	29
PROTOCOLO DE TRATAMIENTOS EN ANIMALES .....	30
HISTOLOGÍA.....	31
INMUNOHISTOQUÍMICA.....	31
INMUNOFLUORESCENCIA .....	31
ECOCARDIOGRAFÍA TRANSTORÁCICA .....	32
ENSAYO POR INMUNOADSORCIÓN LIGADO A ENZIMAS (ELISA) .....	32
ANÁLISIS ESTADÍSTICOS .....	33
<b>RESULTADOS</b> .....	<b>34</b>
LA SEÑALIZACIÓN DE NOTCH 1 EN CÉLULAS HUVEC INFECTADAS CON <i>T. CRUZI</i> AUMENTA DESPUÉS DEL TRATAMIENTO CON SIMVASTATINA .....	34
SIMVASTATINA RECUPERA LA CAPACIDAD ANGIOGÉNICA DE CÉLULAS HUVEC INFECTADAS CON <i>T. CRUZI</i> .....	41
VALIDACIÓN DEL MODELO DE INFECCIÓN CRÓNICA EN RATONES BALB/C .....	44

LA SIMVASTATINA AUMENTA LA EXPRESIÓN Y ACTIVACIÓN DE NOTCH 1 EN RATONES INFECTADOS CRÓNICAMENTE CON <i>T. CRUZI</i> .....	45
SIMVASTATINA, A TRAVÉS DE LA ACTIVACIÓN DE NOTCH 1, REVIERTE EL REMODELADO CARDÍACO EN ANIMALES INFECTADOS CRÓNICAMENTE CON <i>T. CRUZI</i> .....	49
SIMVASTATINA A TRAVÉS DE LA ACTIVACIÓN DE NOTCH 1 REVIERTE EL DAÑO DE LA FUNCIÓN CARDÍACA EN ANIMALES CRÓNICAMENTE INFECTADOS CON <i>T. CRUZI</i> .....	52
<b>DISCUSIÓN</b> .....	<b>60</b>
<b>CONCLUSIÓN</b> .....	<b>67</b>
<b>REFERENCIAS</b> .....	<b>68</b>
<b>PUBLICACIONES DERIVADAS DE ESTA TESIS</b> .....	<b>73</b>
ARTÍCULOS .....	73
PRESENTACIONES A CONGRESO .....	73

## ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Esquema de la vía de señalización de Notch.....	22
Figura 2. Simvastatina activa Notch 1 en células endoteliales infectadas con <i>T. cruzi</i> .....	35
Figura 3. La activación del receptor de Notch con simvastatina induce traslocación efectiva de NICD al núcleo de las células HUVEC infectadas con <i>Trypanosoma cruzi</i> .....	38
Figura 4. Simvastatina aumenta el número de células HUVEC infectadas con <i>T. cruzi</i> que exponen el receptor Notch 1 en la superficie de la membrana. ....	39
Figura 5. La señalización de Notch 1 se activa por simvastatina a través del aumento de presenilina 1 en células HUVEC infectadas con <i>T. cruzi</i> .....	40
Figura 6. Simvastatina aumenta la formación de estructuras tubulares mediado por Notch 1 en células HUVEC infectadas con <i>T. cruzi</i> . ....	42
Figura 7. Parasitemia en ratones BALB/c infectados con <i>T. cruzi</i> .....	45
Figura 8. Simvastatina aumenta la expresión de Notch 1 en animales crónicamente infectados con <i>T. cruzi</i> . ....	46
Figura 9. Simvastatina aumenta la activación de Notch 1 en animales crónicamente infectados con <i>T. cruzi</i> . ....	47
Figura 10. Simvastatina aumenta la activación de Notch 1 a través de Hes 1 en animales crónicamente infectados con <i>T. cruzi</i> . ....	48
Figura 11. Simvastatina y 15-epi-LXA <sub>4</sub> atenúan el daño en tejido cardíaco y la fibrosis de animales crónicamente infectados con <i>T. cruzi</i> . ....	50
Figura 12. Simvastatina normaliza la funcionalidad cardíaca en ratones BALB/c crónicamente infectados con <i>T. cruzi</i> .....	54
Figura 13. Simvastatina promueve la angiogénesis en ratones BALB/c crónicamente infectados con <i>T. cruzi</i> . ....	57
Figura 14. Sobrevida y carga parasitaria de los ratones BALB/c infectados con <i>T. cruzi</i> . ....	59

## ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Partidores humanos utilizados para qPCR.....	30
---	----



## RESUMEN

La enfermedad de Chagas es una parasitosis causada por el protozoo *Trypanosoma cruzi*. Es endémica en Latinoamérica, pero por la migración poblacional, hay casos reportados en Europa, Japón y Australia, entre otros países. Clínicamente presenta dos fases: una aguda, generalmente asintomática, que sin terapia evoluciona a una fase crónica, en la cual el 30% de los casos al cabo de 10-30 años después de adquirir el parásito, desarrolla complicaciones cardíacas, digestivas o ambas.

Actualmente el tratamiento de la EC se realiza con benznidazol, fármaco tripanocida efectivo en la fase aguda, no así en la fase crónica. La cardiomiopatía chagásica crónica (CCC) es la manifestación más grave de la enfermedad. Se caracteriza por una progresiva miocarditis que daña el tejido cardíaco provocando una disfunción cardíaca. Pese a la intensa investigación, *no existen tratamientos exitosos capaces de detener o revertir el daño cardíaco.*

En investigaciones previas se describió que simvastatina a través de 15-epi-lipoxinaA<sub>4</sub> (15-epi-LXA<sub>4</sub>) normaliza la función endotelial y disminuye la inflamación miocárdica. Se ha descrito que simvastatina activa la vía Notch 1 luego de un daño isquémico en tejido neuronal, mejorando la perfusión al promover angiogénesis. Dado que la fisiopatología de CCC implica inflamación miocárdica, daño endotelial con microfocos de isquemia y fibrosis irreversible, resulta interesante buscar agentes farmacológicos que modulen Notch 1 para revertir el daño cardíaco inducido por *T. cruzi* y que puedan ser rápidamente incorporados a la terapia de CCC en humanos. Por lo tanto, se propone que *simvastatina revierte la progresión del daño cardíaco inducido por la infección crónica de T. cruzi, a través de la activación de la vía Notch 1, mediado por la producción de 15-epi-LXA<sub>4</sub>, in vitro e in vivo.*

Los resultados obtenidos en esta tesis indican que *T. cruzi* activa Notch 1 en células HUVEC. Simvastatina activa la vía en mayor proporción, con la consecuente formación

de estructuras tubulares, lo cual es dependiente de la actividad de  $\gamma$ -secretasa e independiente de la producción de 15-epi-LXA<sub>4</sub>. En el modelo murino de CCC, simvastatina mejora la función cardíaca, disminuye la inflamación y la remodelación cardíaca, además de promover la angiogénesis, a través de Notch 1, independiente de la carga parasitaria.

Por lo tanto, simvastatina al activar la vía Notch 1 mejora las condiciones cardíacas al aumentar la perfusión, a pesar del daño inducido por *T. cruzi*. Así, como proyección de los resultados presentados en esta tesis, se propone estudiar el reposicionamiento de simvastatina, y en general, de las estatinas, para el manejo integral de personas con enfermedad de Chagas, como una nueva indicación clínica de este grupo de fármacos.

Tesis financiada por Proyectos FONDECYT 1170126, CONICYT 21151001 y REDES170126.

## Summary

Chagas disease (CD) is a parasitosis caused by the *Trypanosoma cruzi* protozoan. It is endemic in Latin America; however, due to population migration, there are cases reported in Europe, Japan, and Australia, among other countries. Clinically, it has two phases: an acute, often asymptomatic phase that without therapy evolves into the chronic phase, where 30% of cases develop cardiac, digestive, or both complications, after 10-30 years after acquiring the parasite.

Currently, the treatment for CD is benznidazole, an effective trypanocidal drug in the acute phase, but not in the chronic phase. Chronic chagasic cardiomyopathy (CCC) is the most severe manifestation of the disease. It is characterized by progressive myocarditis damaging cardiac tissue; thus, causing cardiac dysfunction. Despite intense research, there are no successful treatments capable of stopping or reversing heart damage.

Previous research described that simvastatin through 15-epi-lipoxinA<sub>4</sub> (15-epi-LXA<sub>4</sub>) restores endothelial function and decreases myocardial inflammation. It has been described that simvastatin activates the Notch 1 pathway after ischemic damage in neuronal tissue, improving perfusion by promoting angiogenesis. Since the pathophysiology of CCC involves myocardial inflammation, endothelial damage with ischemic microfoci, and irreversible fibrosis, it is interesting to search for pharmacological agents modulating Notch 1 to reverse the *T. cruzi-induced* cardiac injury, and that can be promptly incorporated into CCC therapy in humans. Therefore, it is proposed that *simvastatin reverses the progression of cardiac damage induced by chronic T. cruzi infection, through activation of the Notch 1 pathway, mediated by the production of 15-epi-LXA<sub>4</sub>, in vitro and in vivo.*

The results from this thesis suggest that the *T. cruzi* parasite activates Notch 1 in HUVEC cells. Simvastatin also activates the pathway in mayor proportion, with the consequent formation of tubular structures, which is dependent on  $\gamma$  secretase activity

and independent of the production of 15-epi-LXA<sub>4</sub>. In the murine model of CCC, simvastatin improves cardiac function, decreases inflammation and cardiac remodeling, in addition to promoting angiogenesis through Notch 1, independent of the parasitic load.

Therefore, simvastatin by activating the Notch 1 pathway improves cardiac conditions by increasing perfusion, despite the damage induced by *T. cruzi*.

Thus, as a projection of the results presented herein, we propose to study statin repositioning for the comprehensive management of patients with Chagas disease as a new clinical indication for this group of drugs.

This work was financed by FONDECYT 1170126, CONICYT 21151001 y REDES170126 grants

## **INTRODUCCIÓN**

### **ASPECTOS GENERALES DE LA ENFERMEDAD DE CHAGAS**

La enfermedad de Chagas (EC) (Ribeiro et al. 2009), causada por el parásito protozoario, *Trypanosoma cruzi*, es endémica en Latinoamérica y se transmite directamente desde insectos vectores hematófagos como el *Triatoma infestans*, o “vinchuca”. La transmisión también puede ocurrir a través de mecanismos no vectoriales como transfusión sanguínea, trasplante de órganos infectados, transmisión vertical madre-hijo y vía oral (Rassi 2010).

El parásito *T. cruzi* posee una población no homogénea y se han descrito diferentes cepas en la naturaleza que poseen variaciones específicas entre ellas, como la capacidad infectante, el comportamiento en el hospedero, la capacidad de inducir al sistema inmune, la preferencia por tejido específico y la sensibilidad o resistencia a los agentes farmacológicos (Prata 2001).

A nivel mundial, más de 6 millones de personas se encuentran infectadas, siendo la mayoría de los casos pertenecientes a América Latina y se presentan 36.800 nuevos casos cada año. Sin embargo, el perfil epidemiológico de la enfermedad ha cambiado y aumentado en Estados Unidos, Canadá, Europa, Japón y Australia, principalmente por la migración de la población entre América Latina y los otros continentes (Albajar-Viñas and Dias 2014)

### **EVOLUCIÓN CLINICO-PATOLÓGICA DE LA ENFERMEDAD DE CHAGAS**

La EC se caracteriza por una fase aguda o inicial, que ocurre cuando se produce la infección, con una duración de 2 a 4 semanas, y se presenta de manera asintomática o con síntomas inespecíficos. Se pueden presentar síntomas característicos como el signo de Romaña, que corresponde a un edema periorbital producto de la infección; sin embargo, menos del 1% de los pacientes presentan síntomas clínicos como

miocarditis aguda, hepatomegalia, linfadenopatías, derrame pericárdico y meningoencefalitis (Bern 2015). Una vez superada la fase aguda, los pacientes entran en una etapa crónica indeterminada de la enfermedad en la cual no se presentan síntomas. Disminuye la parasitemia por acción del sistema inmune del hospedero; pero los parásitos no desaparecen, sino que se mantienen dentro de las células, generando una persistente inflamación (Bern 2015). En algunos casos, la enfermedad evoluciona a la fase crónica sintomática, que se manifiesta décadas después de la infección y las manifestaciones clínicas son órgano específicas: cardíacas, digestivas o una combinación de ambas (Albajar-Viñas and Dias 2014).

La CCC se caracteriza por infiltrados inflamatorios, isquemia focal y distintos grados de fibrosis (Ribeiro et al. 2012). A pesar de que la cardiomiopatía chagásica se presenta similar a la idiopática, los pacientes con CCC tienen peor pronóstico, por la persistencia del parásito, la inflamación crónica y el remodelado cardíaco por la fibrosis (Gutierrez et al. 2009).

La miocarditis chagásica crónica progresa lentamente e involucra todas las cámaras cardíacas, los nervios cardíacos parasimpáticos y el sistema de conducción (Marin-Neto et al. 2007), lo que origina insuficiencia cardíaca, arritmias, bloqueos en la conducción, tromboembolismo, accidentes cardiovasculares y muerte súbita (Rassi 2010). Una manifestación temprana es la anormalidad en la contracción de la pared del ventrículo izquierdo (VI), lo que se asocia con las arritmias (Nunes et al. 2013). Otra característica de la CCC es la prevalencia de un aneurisma apical izquierdo, que se encuentra en 8,5% de los casos asintomáticos y en 45% de los casos con disfunción sistólica ventricular y falla cardíaca (Viotti 2004). Estos aneurismas predicen tromboembolismos y accidentes cerebrovasculares. En todo caso, la disfunción diastólica es un marcador importante de CCC y generalmente precede a la disfunción sistólica debido a que la miocarditis afecta la relajación ventricular y el llenado diastólico (Nunes et al. 2009).

Varios estudios demuestran que CCC cursa con isquemia por falta de perfusión, debido al daño que se produce en la microcirculación, lo que contribuye a la muerte de cardiomiocitos y como consecuencia, aumenta la fibrosis reparativa (Healy et al. 2015). La dilatación de las células miocárdicas en compensación de las alteraciones funcionales lleva a una miocardiopatía dilatada. Simultáneamente se favorece el adelgazamiento de la pared ventricular, la aparición del aneurisma ventricular y la cardiomegalia favorece los trombos de pared (Ribeiro et al. 2012) y la posibilidad de tromboembolismos.

### **FISIOPATOLOGÍA DE LA ENFERMEDAD DE CHAGAS**

Los tripomastigotes, forma infectiva del parásito, invaden todo tipo de células nucleadas, pero poseen un tropismo intrínseco hacia el tejido cardíaco y tracto gastrointestinal (Andrade et al. 1999), que explica que las lesiones más importantes ocurran en el miocardio produciendo una cardiomiopatía, que es el aspecto clínico más importante de la enfermedad, debido a su frecuencia y severidad (Rassi 2010).

Durante la primoinfección con el *T. cruzi*, se activan macrófagos y células dendríticas a través de los denominados PAMPS (Patrones Moleculares Asociados a Patógeno), lo que desencadena la producción, en primera instancia, de IL-12. A su vez, la IL-12 induce la síntesis de IFN- $\gamma$  por las células NK. Este a su vez activa a los macrófagos incrementando la producción de IL-12, pero también de TNF- $\alpha$  y NO, lo que contribuye a la eliminación del parásito, o al menos a controlar su replicación. Además, el IFN- $\gamma$  también contribuye al reclutamiento de células T, al inducir la producción de quimioquinas y moléculas de adhesión. La población predominante de linfocitos T en el sitio de la primoinfección es CD8+. Por lo tanto, la generación de citoquinas inflamatorias y células citolíticas al inicio de la infección es crítica en la contención del parásito. Este proceso es crítico y de hecho se postula que el delicado equilibrio entre el proceso inflamatorio y su resolución es clave para prevenir el daño tisular. Se ha demostrado que la IL-10 cumple un rol inmunomodulador en este

proceso. Por otro lado, IL-17 también controla la inflamación cardíaca al modular la respuesta T helper 1 (Th1). En todo este proceso la persistencia del parásito es crucial y es causal de una persistente respuesta Th1. De hecho, se ha asociado una respuesta predominante Th1 (donde está aumentada la expresión de IL-6, IL-1 y TNF- $\alpha$ , contribuyendo a la contención de la replicación parasitaria y la parasitemia) con el desarrollo de la cardiopatía crónica sintomática (Flavia Nardy, Freire-de-Lima, and Morrot 2015); mientras que una respuesta predominantemente Th2 mantiene una fase indeterminada prolongada (Andrade, Gollob, and Dutra 2014).

El IFN- $\gamma$  es central en este proceso, pues activa a los macrófagos y cardiomiocitos para producir TNF- $\alpha$ . En pacientes con CCC, el IFN- $\gamma$  está aumentado y contribuye a la disminución de la contractibilidad, probablemente por apoptosis de cardiomiocitos por la generación de ROS y RNS. Además, regula la fibrosis cardíaca aumentando la proliferación de fibroblastos, la producción de hialuronato y metaloproteinasas 2 y 9. La producción de IFN- $\gamma$  y con ello, el aumento de quimioquinas como CCL3, CCL5, y CXCL1 atraen más células Th1, produciendo una acumulación de éstas, mayor producción de IFN- $\gamma$  y con ello, la perpetuación del proceso inflamatorio y el daño cardíaco que esto conlleva (Acevedo, Girard, and Gomez 2018).

IFN- $\gamma$  y el TNF- $\alpha$  inducen la activación de NF- $\kappa$ B para el control parasitario aumentando la síntesis de iNOS, para generar altas cantidades de NO e intermediarios reactivos de nitrógeno, los cuales tienen actividad tripanocida. Pero también, la activación persistente de NF- $\kappa$ B por IFN- $\gamma$ /TNF- $\alpha$  genera mayor síntesis de ROS, induciendo un desbalance mitocondrial, lo que conlleva a una pérdida de potencial de membrana, generación de ATP y apoptosis, participando activamente en la generación de la fibrosis reparativa hasta un remodelado cardíaco (Booney et al. 2019).



Dentro de la respuesta inflamatoria y sus mediadores, se pueden generar respuestas autoinmunes. Aunque controvertidos, se han propuesto dos mecanismos. Se ha descrito que las células T pueden ser las responsables, principalmente las Th17 y Treg, al reconocer antígenos del parásito que pueden confundirse con componentes propios del hospedero, como la cadena pesada de la miosina y la proteína B13 del parásito, lo que se conoce como *mimetismo* y podría explicar los efectos sobre la contracción cardíaca. El segundo mecanismo, corresponde a la activación inmune inespecífica en un ambiente inflamatorio, lo cual desencadena una respuesta mediada por células T CD4<sup>+</sup> y CD8<sup>+</sup> que no sólo dañan las células infectadas, sino que también las sanas. Estos mecanismos podrían explicar el daño cardíaco crónico (Booney et al. 2019).

#### **TRATAMIENTO FARMACOLÓGICO DE LA ENFERMEDAD DE CHAGAS**

Actualmente el objetivo del tratamiento para la enfermedad de Chagas es eliminar el parásito con benznidazol, que es efectivo contra todas las formas de los parásitos y útiles principalmente en la fase aguda de la enfermedad (Rassi 2010). Sin embargo, puede causar toxicidad sistémica y reacciones adversas importantes que incluyen hipersensibilidad (rash cutáneo, fiebre, edema generalizado), polineuropatías periféricas, leucopenia, trombocitopenia y mutagénesis en terapias a largo plazo, que obligan a suspender el tratamiento (Prata 2001). En el estudio clínico BENEFIT se analizó la eficacia y seguridad de benznidazol en la sintomatología de la cardiopatía chagásica crónica en pacientes. No obstante, este tratamiento no logró disminuir las complicaciones cardíacas como la taquicardia ventricular y la falla cardíaca, entre otras, a pesar de la importante disminución de la carga parasitaria (Morillo et al. 2015).

El tratamiento de la CCC es sintomático siguiendo las recomendaciones clínicas para el manejo de la falla cardíaca. El tratamiento de primera línea para las cardiopatías, son los inhibidores de la enzima convertidora de angiotensina (IECA) y los  $\beta$

bloqueadores, sin embargo, estos últimos pueden producir bradiarritmias (Botoni et al. 2007). A pesar de que estos tratamientos cuentan con el apoyo de distintos estudios clínicos, los datos no se enfocan directamente en la falla cardíaca producida por la CCC. El trasplante cardíaco es el tratamiento de elección en aquellos casos con falla cardíaca avanzada resistente al tratamiento farmacológico. En la actualidad el trasplante en caso de cardiomiopatía refractaria ha demostrado ser una excelente alternativa. Hasta el 45% de los pacientes trasplantados experimentan reactivación, pero con el tratamiento antiparasitario adecuado, la enfermedad se puede contener. Tal vez debido a que son pacientes más jóvenes, el paciente chagásico trasplantado tiene un mejor pronóstico a pesar de la reactivación (Bestetti and Theodoropoulos 2009; Gray et al. 2018).

La muerte súbita puede ocurrir en cualquier etapa que presenta la EC. Generalmente es consecuencia de fibrilación ventricular, que puede o no estar precedida por una taquicardia ventricular. Para prevenir las arritmias y la muerte súbita, se ha usado amiodarona, pero no hay suficiente evidencia clínica que avale el uso de este fármaco en EC (Bestetti and Cardinalli-Neto 2008), aunque un reciente metaanálisis recomienda su uso, tomando siempre en consideración los riesgos del uso de este agente (Stein et al. 2018).

Lamentablemente, no se han descubierto nuevos agentes antichagásicos clínicamente superiores a los usados en la actualidad, no hay desarrollo de vacunas y no existen tratamientos concretos que puedan revertir el daño cardíaco producido, *por lo que se necesitan nuevas estrategias que mejoren o disminuyan las manifestaciones clínicas cardíacas que se presentan en la fase crónica para mejorar la calidad de vida de los pacientes.*

## **ESTATINAS EN EL CONTEXTO DE LA CARDIOPATIA CHAGÁSICA CRÓNICA**

En la búsqueda de nuevos blancos terapéuticos y fármacos antichagásicos, se han considerado a los agentes hipolipemiantes como las estatinas. Sus efectos pleiotrópicos, entre los cuales destacan los efectos antiplaquetarios, antiinflamatorios y vasodilatadores podrían ser también útiles para mejorar las condiciones de la CCC. Los efectos de las estatinas están mediados, en parte por 15-epi-lipoxina A<sub>4</sub> (15-epi-LXA<sub>4</sub>), un eicosanoide proresolutorio de la inflamación. Estos eicosanoides son como grupo, un conjunto de moléculas derivadas de ácidos grasos poliinsaturados como el ácido araquidónico, ácido docosahexaenoico o el ácido eicosapentaenoico. A este grupo de lípidos pertenecen las protectinas, maresinas, resolvinas y lipoxinas (Serhan et al. 2014). La 15-epi-LXA<sub>4</sub> pertenece al grupo de las lipoxinas, derivadas del ácido araquidónico por acción de una actividad de 15-lipooxigenasa. Sin embargo, se encontró que la aspirina, al acetilar la ciclooxigenasa 2 (COX-2), producía en ella un cambio metabólico hacia una actividad de 15-epimerasa, lo que permite generar la 15-epi-LXA<sub>4</sub> (denominada también lipoxina gatillada por aspirina) (Serhan 2002). Posteriormente se encontró que la nitrosilación de COX-2, inducida por la acción de estatinas al aumentar la actividad de eNOS (Levy 2006), también era capaz de generar 15-epi-LXA<sub>4</sub>. Las lipoxinas y algunas resolvinas actúan directamente en el receptor FPR2/ALX (Petri et al. 2015; Chiang, Arita, and Serhan 2005), acoplado a proteína G, que dependiendo del tipo celular, se acopla a distintos elementos de la cascada de transducción de señales: por ejemplo en macrófagos se asocia a Gi/Go para disminuir la polimerización de actina, disminuyendo así el infiltrado leucocitario (Basil and Levy 2016); además, como en todas las vías de señalización, también existe *cross-talk* con otras vías, como por ejemplo la que gobierna a NF-κB y eventualmente también con Notch.

Como la CCC cursa con procesos inflamatorios crónicos debido a la persistencia del parásito en tejido cardíaco, se presumen necesarios los efectos antiinflamatorios de

las estatinas. Estudios previos en nuestro laboratorio demostraron que la simvastatina, a través de la producción de 15-epi-lipoxina A<sub>4</sub>, disminuye la inflamación y producción de moléculas de adhesión, normalizando la función endotelial (Campos-Estrada et al. 2015) y mejorando el daño en el tejido cardíaco de ratones BALB/c infectados con *T. cruzi* (González-Herrera et al. 2017). La simvastatina es una estatina que ha demostrado tener la capacidad para aumentar la formación de estructuras vasculares y promover procesos angiogénicos, independiente de la disminución de colesterol, en modelos isquémicos; por lo tanto, *se puede postular que estatinas como la simvastatina podrían mejorar la baja perfusión producida en la CCC y sus consecuencias.*

## **VÍA DE SEÑALIZACIÓN DE NOTCH 1**

Se ha descrito que simvastatina induce la actividad de la vía de Notch frente a un daño isquémico, promoviendo angiogénesis y mejorando la perfusión en un modelo de isquemia cerebral (Xu et al. 2009; Zacharek et al. 2009), lo que hace a esta vía un blanco terapéutico novedoso.

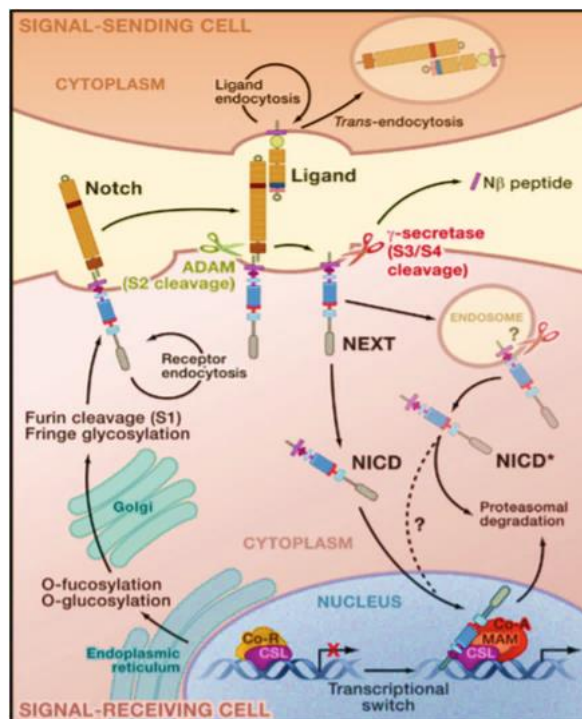
La vía de señalización de Notch participa en la comunicación intercelular entre células adyacentes y está involucrada en procesos celulares como la determinación del destino celular, diferenciación, proliferación y apoptosis. Se ha descrito que la vía Notch es fundamental en la cardiogénesis y la identificación de mutaciones de Notch se relaciona con enfermedades cardiovasculares congénitas. La señalización de Notch está involucrada en la diferenciación de cardiomiocitos, la formación del canal atrioventricular, el desarrollo de las válvulas cardíacas, la trabeculación ventricular y la remodelación del tracto de flujo (High and Epstein 2008).

Se compone de cuatro receptores Notch (1-4) y cinco ligandos, Jagged 1, Jagged 2, Delta-like 1, Delta-like 3 y Delta-like 4 (Li, Hiroi, and Liao 2010). La vía de Notch es un sistema de comunicación de corto alcance entre dos células adyacentes. La

activación del receptor por su ligando implica una secuencia de eventos proteolíticos precisos. En primer lugar, cuando el ligando se une al receptor de Notch se produce un cambio de conformación que expone el receptor a la acción de una proteasa extracelular ADAM10 (*a disintegrin and metalloproteinase*, por su sigla en inglés), que escinde la porción extracelular del receptor y que será endocitada por la célula señalizadora junto con el ligando. A su vez, un intermediario transmembranoso originado es sometido a la actividad de un complejo multiproteico, denominado genéricamente  $\gamma$ -secretasa, que presenta actividad de aspartato proteasa. Este complejo consta de 4 subunidades esenciales: presenilina 1 (Ps 1), nicastrina (Nct), *anterior pharynx defective* (APH1) y potenciador de presenilina 2. El sitio catalítico se encuentra en presenilina 1 y es capaz de realizar la proteólisis de Notch 1 generando un fragmento N-terminal intracelular (NICD, por *N-terminal IntraCelular Domain*) que es la forma activa de Notch, el cual se trasloca al núcleo. En el núcleo el NICD, libera al factor de transcripción CBF-1/*Suppressor of hairless*/Lag-1 (CSL) y permite la expresión de genes de la familia Hrt (Hairy/enhancer of split (Hes), proteínas relacionadas a Hes (Hey), y Notch-regulated ankyrin repeat protein (Nrarp) los cuales a su vez regulan la expresión de otros genes involucrados en la morfogénesis y diferenciación celular en distintos órganos (Kopan and Ilagan 2009).

Aunque se acepta que la regeneración del corazón es mínima, recientemente se ha descrito la existencia de poblaciones de células totipotenciales, las cuales a través de la vía Notch promueven la regeneración del miocardio luego de un infarto (Zhou and Liu 2014). También se ha visto que la activación de Notch 1 limita la hipertrofia del cardiomiocito, promueve la proliferación de células precursoras, protege de la isquemia, induce la angiogénesis e inhibe la fibrosis al inhibir la transformación de fibroblasto a miofibroblasto (Fan et al. 2011). *Por lo tanto, es interesante la búsqueda de agentes que modulen esta vía para disminuir y revertir el daño producido en el tejido cardíaco por T. cruzi.*

Estudios revelan que simvastatina, frente a un ataque isquémico cerebral, activa Notch 1 y aumenta la proliferación de células endoteliales (Xu et al. 2009; Zacharek et al. 2009; Kikuchi et al. 2011). Además, al inyectar directamente el ligando Jagged 1 al corazón en un modelo *in vivo* de infarto al miocardio, se observó menor daño luego de la reperfusión, disminución de fibrosis y angiogénesis (Boopathy et al. 2015). Por otra parte, se ha descrito que pitavastatina aumenta el gen de presenilina 1 en un modelo isquémico (Kikuchi et al. 2011), lo que conlleva a un aumento de la activación de Notch.



**Figura 1. Esquema de la vía de señalización de Notch.**

Se presenta la vía y los distintos eventos proteolíticos. Durante la maduración y el transporte del receptor a la membrana, Notch se escinde en el sistema Golgi en el sitio-1 (S1) por una convertasa similar a la furina, lo que da como resultado un receptor transmembrana heterodimérico. Cuando se une el ligando se induce un cambio conformacional y la metaloproteasa ADAM10 es capaz de escindir a Notch en el sitio-2 (S2) recién expuesto. La escisión de S2 da como resultado un fragmento NEXT que se escinde directamente por el complejo  $\gamma$ -secretasa (S3), para generar el dominio intracelular

(NICD). NICD se transloca al núcleo donde participa en un complejo co-activador que se une a CSL y comienza la transcripción del gen objetivo. Una escisión adicional en el sitio-4 (S4) está mediada por la  $\gamma$ -secretasa en el centro del dominio transmembrana que da como resultado el fragmento N, probablemente destinado a eliminar fragmentos residuales de Notch de la membrana (van Tetering and Vooijs 2011).

*Por lo tanto, es interesante la búsqueda de agentes que modulen la vía Notch en un modelo de infección por T. cruzi para disminuir y, eventualmente, revertir el daño cardíaco. Por esta razón, en este estudio se investigarán los efectos que produce simvastatina al activar la vía Notch 1 en un modelo de infección por T. cruzi in vitro e in vivo y se postula la siguiente hipótesis:*

## **HIPÓTESIS**

Simvastatina, a través de la producción de 15-epi-LXA<sub>4</sub>, activa la vía de Notch 1 para revertir la progresión del daño endotelial y cardíaco inducidos por la infección *in vitro* e *in vivo* de *Trypanosoma cruzi*.



## **OBJETIVOS**

### **OBJETIVO GENERAL**

Evaluar el mecanismo de simvastatina como activador de Notch 1 *in vitro* en células endoteliales y como agente cardioprotector en un modelo murino de cardiomiopatía chagásica crónica.

### **OBJETIVOS ESPECÍFICOS**

1. Evaluar el efecto de simvastatina en células endoteliales infectadas con *T. cruzi* sobre Notch 1, determinando:
  - Niveles de expresión
  - Activación del receptor
  - Formación de tubo endotelial
  
2. Evaluar el efecto de simvastatina en un modelo murino infectado crónicamente por *T. cruzi* sobre Notch 1, determinando
  - Niveles de expresión
  - Activación del receptor
  
3. Evaluar el efecto de Notch 1 modulado por simvastatina en el modelo murino infectado sobre:
  - Sobrevida
  - Remodelación cardíaca
  - Función cardíaca

## MATERIALES Y MÉTODOS

### Cultivos celulares

Se utilizaron células endoteliales de vena umbilical humana (HUVEC (Gibco®, USA)) correspondiente a una línea primaria proveniente de un pool de donantes, del tercer pasaje (F3), las cuales se mantuvieron en Medio 200 suplementado con LSGS (low serum growth supplement), el cual contiene 2% de suero fetal bovino (SFB, Gibco®). Las células VERO (ATCC- CCL-81®) se mantuvieron en medio RPMI 1640 (Biological Industries®, USA) suplementado con SFB 5% y antibióticos 1% (penicilina/estreptomicina, Biological Industries®). Ambos cultivos celulares se mantuvieron en una atmósfera humidificada a 37 °C y CO<sub>2</sub> al 5%.

### Animales

Se utilizaron ratones de la cepa BALB/c de 8 semanas, los cuales se mantuvieron en la Estación Experimental del Programa de Farmacología, con comida y agua *ad libitum*. El manejo de los animales fue acorde a la “Guía para el manejo y cuidado de los animales de laboratorio” (National\_Research\_Council 2011). La manipulación de los animales y los procedimientos experimentales propuestos fueron autorizados por el Comité de Ética de la Facultad de Medicina en el protocolo 0914 FMUC del año 2017 respaldado por el proyecto FONDECYT 1170126, por cuanto el número de ratones, la infección con *T. cruzi*, así como la cantidad y duración de los tratamientos son los mismos que se plantean en el presente proyecto.

### Infección con *T. cruzi*

Para la infección del modelo *in vitro* e *in vivo* se utilizaron tripomastigotes de *T. cruzi* de la cepa Dm28c, obtenidos de células VERO infectadas. Los sobrenadantes de los cultivos de células VERO fueron centrifugados a 500 g por 10 min. Luego, el pellet fue resuspendido en medio RPMI 1640 para alcanzar la concentración deseada de parásitos, cumpliendo con una multiplicidad de infección (MOI) de tres parásitos por célula (3:1). En células HUVEC se agregó al medio tripomastigotes en el MOI indicado durante 16 horas (Campos-Estrada et al. 2015), al cabo de los cuales se

retiró el medio de cultivo y se reemplazó por medio fresco con o sin los distintos tratamientos empleados en esta tesis.

Ratones BALB/c sanos fueron infectados con  $1 \times 10^5$  parásitos por vía intraperitoneal (i.p.), disueltos en 100  $\mu$ L de PBS. A los 10 días, cuando se obtuvo la máxima parasitemia, se extrajo la sangre por punción cardíaca bajo anestesia general. Se juntó la sangre de diferentes donantes, recolectada con anticoagulante EDTA y se diluyó con PBS para obtener una concentración de 10 parásitos/ $\mu$ L. Para los experimentos *in vivo*, se inyectó 100  $\mu$ L de esta sangre por vía i.p. a los ratones BALB/c y se verificó la calidad de la infección midiendo la parasitemia en muestras de sangre obtenida de la punta de la cola, cada dos días post infección (dpi) hasta que el parásito fue indetectable (Molina-Berrios et al. 2013).

#### **Esquema de tratamiento en células HUVEC.**

Se sembraron  $1 \times 10^5$  células HUVEC en placas de 12 pocillos, a las cuales previamente se las incubó con 0,5  $\mu$ M éster de succinimidil-carboxifluoresceína (CFSE, Ex/Em 492/517 nm Biolegend®, USA) durante 5 minutos, una sonda fluorescente para el reconocimiento de éstas. Luego de 24 horas, se infectaron con tripomastigotes de *T. cruzi* durante 16 horas y tras reemplazar el medio de cultivo, las células infectadas se incubaron con concentraciones crecientes de simvastatina (0,005 – 5  $\mu$ M, Sigma Aldrich®, USA), 100nM 15-epi-lipoxina A<sub>4</sub> (Cayman Chemicals®, USA) ó 10  $\mu$ M Jagged 1, (AnaSpec®, USA). Las soluciones stock de los reactivos se prepararon en dimetilsulfóxido (DMSO, Merck®, Alemania). La concentración final de DMSO en los cultivos no fue mayor al 0.025%. El tiempo de incubación varió de 6 a 24 horas y al término de este período se cosecharon las células para ser sometidas a análisis por citometría de flujo.

#### **Citometría de flujo**

Las células HUVEC se lavaron con PBS, y se cosecharon con tripsina e incubaron con la sonda Zombie® UV (1:1000, Ex/Em 350/459 nm, BioLegend®), para determinar viabilidad, durante 30 minutos a 4°C. Luego, las células se incubaron

durante 1 hora con los anticuerpos contra Notch 1 APC (1:200, Ex/Em 600/660 nm, BioLegend®) y Jagged 1 PE (1:200, Ex/Em 488/575 nm, BD Pharmingen®, USA). Posteriormente se lavaron con PBS y se permeabilizaron con el kit Foxp3/Transcription Factor Staining Buffer set (eBioscience®, USA) siguiendo las indicaciones del fabricante para realizar la tinción intracelular. Se incubó con los anticuerpos contra NICD, Hey 1 y Hes 1 durante 1 hora (1:200, abcam®, UK), y se utilizó como anticuerpos secundarios anti-rabbit IgG Brilliant Violet 510 (1:200, Ex/Em 405/510 nm, BioLegend®) ó 421 (1:200, Ex/Em 405/421 nm BioLegend®). La fluorescencia asociada se detectó por citometría de flujo en el equipo LSRFortessa con 30.000 eventos por condición con el software BD FACSDIVA® (BD, Biosciences®, USA).

### **Western Blot**

Se sembraron  $3 \times 10^5$  células HUVEC en placas de 6 pocillos, las cuales se infectaron con *T. cruzi* y se incubaron con simvastatina 0,5  $\mu$ M, 15-epi-lipoxina A<sub>4</sub> 100nM, Jagged 1 10  $\mu$ M, durante 6 horas y 24 horas. Las células se homogenizaron en buffer de lisis a 4 °C (Tris 10 mM pH 8.0; SDS 1% v/v y un cóctel inhibidor de proteasas (Complete Mini, Roche®)). El homogenizado se centrifugó a 15000 g por 15 minutos y las proteínas del sobrenadante se cuantificaron por el método de Bradford utilizando albúmina sérica bovina como estándar (Sigma Aldrich®). Se realizó una electroforesis en gel SDS-poliacrilamida al 10% usando 40  $\mu$ g de proteína total. Posteriormente el gel se transfirió a una membrana de nitrocelulosa, la cual se bloqueó con leche descremada al 10 % (v/v) en TBS-Tween (Merck ®) durante 1 hora. Las membranas se incubaron con anticuerpos primarios contra Notch 1 (1:500, abcam®), presenilina 1 (1:100, abcam®) y GAPDH (1:100, Santa Cruz Technologies®, USA) como control de carga, durante la noche a 4°C. Luego se incubaron con anticuerpo secundario anti-rabbit IgG conjugado a HRP (1:5000). Las membranas se revelaron por quimioluminiscencia utilizando Immobilon® (Merck®) de acuerdo con las instrucciones del fabricante con el scanner c-DiGit® con ayuda del

software Image Studio (LI-COR® Bioscience, USA). El análisis se realizó por densitometría de las bandas utilizando el software Image J (ImageJ 1.6v)

### Ensayo de formación de tubo

Se sembraron  $5 \times 10^4$  células HUVEC en placas de 12 pocillos, las cuales se infectaron con  $1,5 \times 10^5$  tripomastigotes por 16 horas. Luego, las células se cosecharon y se sembraron en una cámara Lab-tek II (Invitrogen®) de 4 pocillos (previamente tratada con Matrigel (Corning®, USA)). Las células se trataron con simvastatina 0,5  $\mu$ M, Jagged 1 10  $\mu$ M, N-[N-(3,5-difluorofenacetil) -L-alanil]-S-fenilglicina t-butil éster (DAPT, 10  $\mu$ M Tocris®, UK, un inhibidor de la vía Notch,) y LY294022 (10  $\mu$ M, CellSignaling®, USA, un inhibidor de PI3K) durante 24 horas a 37 °C. Las estructuras se fotografiaron y se analizaron en un microscopio Motic BA310 acoplado con cámara 5,0 MP Moticam, cuantificando las estructuras tipo tubo con el software Wimasis® (Wimasis, 2016, Tube Formation Assay Image Analysis Solution. Release 4.0).

### Ensayo de RT-qPCR

Se sembraron  $3 \times 10^5$  células HUVEC en placas de 6 pocillos, se infectaron con *T. cruzi* y se trataron con simvastatina 0,5  $\mu$ M, 15-epi-lipoxina A4 100nM o Jagged 1 10  $\mu$ M. Se homogenizaron con TRIzol® (Invitrogen®, USA) para la extracción de RNA total según las indicaciones del fabricante. La transcripción inversa se realizó con el kit de transcriptasa inversa M-MLV (Invitrogen®, USA) según las instrucciones del fabricante. Las reacciones de qPCR se realizaron con SYBR® Green PCR Master Mix (Bioline®, USA), utilizando los partidores humanos de la **Tabla 1**. La expresión génica relativa se analizó utilizando el método  $2^{-\Delta\Delta Ct}$ . Los niveles de mRNA se relativizaron utilizando GAPDH como gen constitutivo.

Gen	Forward primer	Reverse primer
NOTCH 1	ACCCTTTTCTGGGGAAAGAC ACTG	GGCTCTGGCAAGTCTCCTACA AAA
JAG 1	CTGCCTTTCAGTTTCGCCTG	ACTGTCAGGTTGAACGGTGTC

HES 1	GCACAGAAAGTCATCAAAG CCT	GAGTGCGCACCTCGGTATTA
PSN 1	CGGGGAAGCGTATACCTAAT CT	ACGGTGCAGGTAAGTCTGTCT
GAPDH	AAAGCCTGCCGGTGACTAAC	CCCAATACGACCAAATCAGAG AATA

**Tabla 1. Partidores humanos utilizados para qPCR**

Para determinar la carga parasitaria en los corazones de los ratones infectados con *T. cruzi*, se aisló el ADN utilizando el Kit de purificación de ADN genómico Wizard (Promega, USA), siguiendo las instrucciones del fabricante. El ADN se cuantificó en función de la absorbancia a 280 nm utilizando un espectrofotómetro Varioskan (Thermo Scientific, USA). La amplificación del ADN se realizó con SYBR® Green PCR Master Mix utilizando partidores de ADN satélite para *T. cruzi* Dm28c, F 5'-3'GCTCTTGCCACAMGGGTGC y R 3'-5'CAAGCAGCGGATAGTTCAGG en un equipo Applied Biosystems 7300 RT-PCR system (Thermo Fisher). La carga parasitaria de los tejidos cardíacos infectados se calculó desde una curva estándar generada de un tejido cardíaco homogenizado y enriquecido con 10<sup>6</sup> tripomastigotes de *T. cruzi* y diluciones seriadas en un rango de 10<sup>1</sup> a 10<sup>6</sup> parásitos equivalentes/mL de acuerdo con Duffy et al (Duffy et al. 2013). El límite de detección del ensayo fue 0,7 par. eq/mL (IC 95% 0,0089–0,7925) y un límite de cuantificación de 1,86 par. eq/mL de homogenizado.

### **Protocolo de tratamientos en animales**

Los ratones BALB/c infectados fueron tratados con: simvastatina 1 mg/Kg/día (MSD, UK), 15-epi-LXA<sub>4</sub> 25 µg/kg/día (Cayman Chemicals®), simvastatina 1 mg/Kg/día + DAPT (Tocris®), simvastatina 1 mg/Kg/día + AA861 1 mg/Kg/día (inhibidor de 5-LOX (5-lipooxigenasa), Santa Cruz®, USA), 15-epi-LXA<sub>4</sub> 25 µg/Kg/día + DAPT 10 mg/Kg/día. Simvastatina fue disuelta en una suspensión de carboximetilcelulosa (CMC) al 0,5% y administrada mediante sonda por vía oral una vez al día, mientras que 15-epi-LXA<sub>4</sub>, DAPT y AA861 fueron disueltos en PBS y administrados 100 µL i.p. una vez al día. Los tratamientos fueron administrados desde el día 60 hasta el día

80 p.i. Finalmente, los animales se eutanasiaron el día 80 p.i y se extrajeron los corazones para posterior análisis.

### **Histología**

Los corazones extraídos se fijaron en formaldehído 4% (pH 7.3) durante 12 horas, se deshidrataron en alcohol y clarificaron en xileno para luego ser embebidos en parafina y seccionados a 5  $\mu$ m. Los cortes de parafina se tiñeron con hematoxilina-eosina para observar arquitectura y organización cardíaca. Además, se tiñeron con rojo picrosirio (Sigma Aldrich®) para observar organización de colágeno. Las imágenes se obtuvieron con el microscopio Motic BA310 acoplado con cámara 5,0 MP Moticom y se analizaron con el software Image J v.1.6.

### **Inmunohistoquímica**

Las proteínas de la vía Notch 1 se evaluaron en los tejidos cardíacos por técnica de inmunoperoxidasa utilizando anticuerpos primarios contra Notch 1 (1:200), NICD (1:100) y Hes 1 (1:200) (abcam®). Se realizó la tinción utilizando un kit de peroxidasa y diaminobenzidina como cromóforo según las instrucciones del fabricante (RTU-Vectastain kit®, Vector Laboratories, USA). Los cortes de corazón se tiñeron con hematoxilina. Las imágenes se obtuvieron con microscopio Motic BA310 acoplado con cámara 5,0 MP Moticom y se analizaron con el software Image J v.1.6.

### **Inmunofluorescencia**

Para determinar angiogénesis, los tejidos cardíacos se evaluaron por inmunoensayo con triple tinción para Ki67 (1:200, Cell Signaling®, un marcador de proliferación celular), conjugado con Alexa 647 (1:200, Invitrogen®), e isolectina B4 conjugada con Alexa 594 (1:200, Invitrogen®) para determinar la línea endotelial murina y DAPI como marcador de núcleos. Además, para evaluar la vía de Notch se marcó endotelio y NICD (1:100, abcam®) conjugado con Alexa 647 (1:200, Invitrogen®). Las imágenes se obtuvieron con el microscopio confocal Spinning Disk (Perkin

Elmer) con lente 40X en aceite (NA = 1,3). El procesamiento de las imágenes se realizó desde 5 campos por corazón utilizando el software Fiji.

### **Ecocardiografía transtorácica**

Los estudios ecocardiográficos se realizaron en los ratones BALB/c previo a la infección (sanos), al día 40 p.i (previo al tratamiento) y al día 80 p.i (post-tratamiento). Los ratones se colocaron en posición supina, fueron ligeramente sedados con isoflurano (1,5%) y se les afeitó el pecho con crema depilatoria. Para la ecocardiografía se usó un transductor iRL- RS de 13 MHz con un ecocardiógrafo Vivid i® (General Electric®, USA) y se obtuvieron imágenes bidimensionales (modo B) del ventrículo izquierdo. Con ayuda del software EchoPAC versión 113 (General Electric®, USA) se obtuvo el diámetro ventricular izquierdo y el diámetro de la pared posterior en sístole, de acuerdo con las recomendaciones de la Sociedad Americana de Ecocardiografía (Schiller et al., 1989; Sahn et al., 1978). Los parámetros de funcionalidad cardíaca como fracción de eyección (FE) y la fracción de acortamiento (FA) fueron calculados con la ecuación de Teicholz para modelos de ecocardiografía (Chengode 2016).

$$FE = \left( \left[ \frac{7dd^3}{2,4 + dd} \right] - \left[ \frac{7ds^3}{2,4 + ds} \right] \right) \times 100$$

*dd = diámetro diástolico; ds = diámetro sistólico*

### **Ensayo por inmunoadsorción ligado a enzimas (ELISA)**

La sangre de los ratones BALB/c se obtuvo a través de punción cardíaca el día 80 p.i, se centrifugó y el suero obtenido se guardó a  $-80$  °C. Las muestras de suero se utilizaron para analizar TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$  e IL-10. La cuantificación de las citoquinas se realizó utilizando ELISAs con anticuerpos monoclonales del kit ELISA Max Deluxe Set para ratón para TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$  e IL-10 (Biolegend®) de acuerdo con las instrucciones del fabricante. Las placas de ELISA se leyeron a una longitud de onda de 450 nm en un lector de placa Asys Expert Plus (Biochrome®, UK). Todas las muestras se ensayaron en duplicado.



### **Análisis estadísticos**

Los resultados se expresaron como promedio  $\pm$  SEM de cinco o más experimentos independientes. La normalidad de los datos se analizó con el test de Shapiro-Wilk y el análisis de varianza se realizó con ANOVA de una vía seguido de un post test de Dunnett o Tukey. Un valor de  $p \leq 0,05$  fue considerado estadísticamente significativo. La supervivencia de los ratones de los distintos grupos se analizó por el método no paramétrico de Kaplan-Meier. Todos los análisis estadísticos se realizaron con el software Prisma 8.0 (GraphPad Prism, USA).

## RESULTADOS

**OBJETIVO 1:** Evaluar el efecto de simvastatina en células endoteliales infectadas por *T. cruzi* sobre Notch 1 en los niveles de expresión y en la activación del receptor.

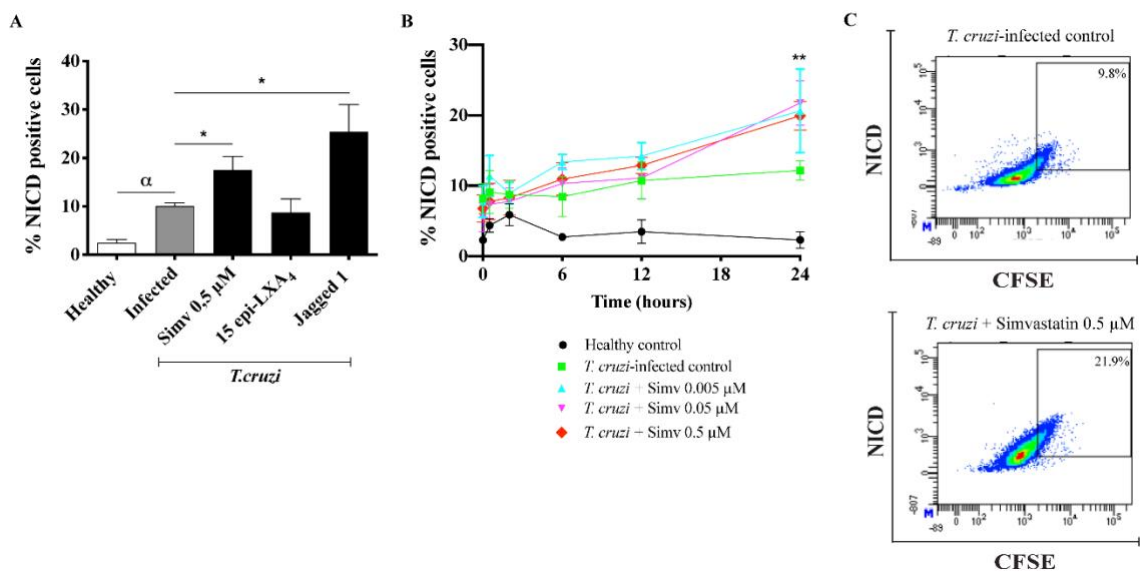
### **La señalización de Notch 1 en células HUVEC infectadas con *T. cruzi* aumenta después del tratamiento con simvastatina**

La primera aproximación al modelo celular en estudio fue verificar la integridad y actividad de la vía en las células HUVEC. Es necesario recordar, que la vía de señalización de Notch está activa durante el desarrollo cardiovascular en la embriogénesis; sin embargo, diversas situaciones patológicas pueden activar esta vía en la vida adulta. La **Figura 2** presenta la respuesta de una población de células HUVEC a la infección con *T. cruzi* y posterior tratamiento con simvastatina después de 24 horas de incubación. Como se puede observar en la **Figura 2A**, la infección con *T. cruzi* incrementó el número de células en las cuales es positiva la señal para el fragmento NICD, indicando que la vía es activa, tal y como se comprueba con el control positivo Jagged 1, y que responde ante condiciones patológicas. Interesantemente, la simvastatina aumentó significativamente el número de células HUVEC infectadas con *T. cruzi* y positivas para NICD ( $p=0,0182$ ). Por otra parte, la actividad de 15-epi-LXA<sub>4</sub> no fue diferente a la inducida por la presencia del parásito en las células HUVEC, por lo cual es probable que esta molécula no afecte el comportamiento de la vía.

La **Figura 2B** presenta el efecto que tienen distintas concentraciones de simvastatina sobre la actividad de la vía de Notch en una población de células HUVEC. De las tres concentraciones evaluadas se eligió 0,5  $\mu\text{M}$ , que fue la concentración máxima efectiva. Concentraciones mayores a 0,5  $\mu\text{M}$  alteraron la viabilidad celular, por lo que no fueron estudiadas.

Complementariamente a evidenciar la activación de la vía, se evaluó su funcionalidad determinando expresión de las proteínas reporteras Hes 1, Hey 1 y Jagged 1 mediante citometría de flujo (**Figuras 2 y 3**).

Se ha descrito que la activación del receptor corresponde al evento en el cual se libera el dominio intracelular de Notch 1 (NICD, mostrado en la **Figura 2**), el cual se trasloca al núcleo actuando como un activador transcripcional, aumentando la expresión de genes relacionados con proliferación y diferenciación como, por ejemplo, los que pertenecen a la familia Hes o expresión cis de los ligandos de la vía, como Jagged 1 (**Figura 3**).



**Figura 2. Simvastatina activa Notch 1 en células endoteliales infectadas con *T. cruzi*.**

1 x 10<sup>5</sup> células HUVEC marcadas con CFSE fueron infectadas con tripomastigotes de *T. cruzi* (Dm28c) durante 16 horas y tratadas con simvastatina 0,005 μM - 0,5 μM a distintos tiempos. **A)** Cuantificación de la fracción positiva para NICD de células HUVEC a 24 horas de incubación con simvastatina 0,5 μM, 15-epi-LXA<sub>4</sub> 100 nM o Jagged 1 10 μM. **B)** Evaluación de la activación del receptor de Notch 1, en función del tiempo, y de la fracción positiva para NICD de células HUVEC infectadas con *T. cruzi* e incubadas con diferentes concentraciones de simvastatina. **C)** Representación *dot plot* de poblaciones de células HUVEC infectadas con *T. cruzi* (*dot plot* superior) y tratadas con simvastatina 0,5 μM. En el cuadrante se indica la población de células HUVEC

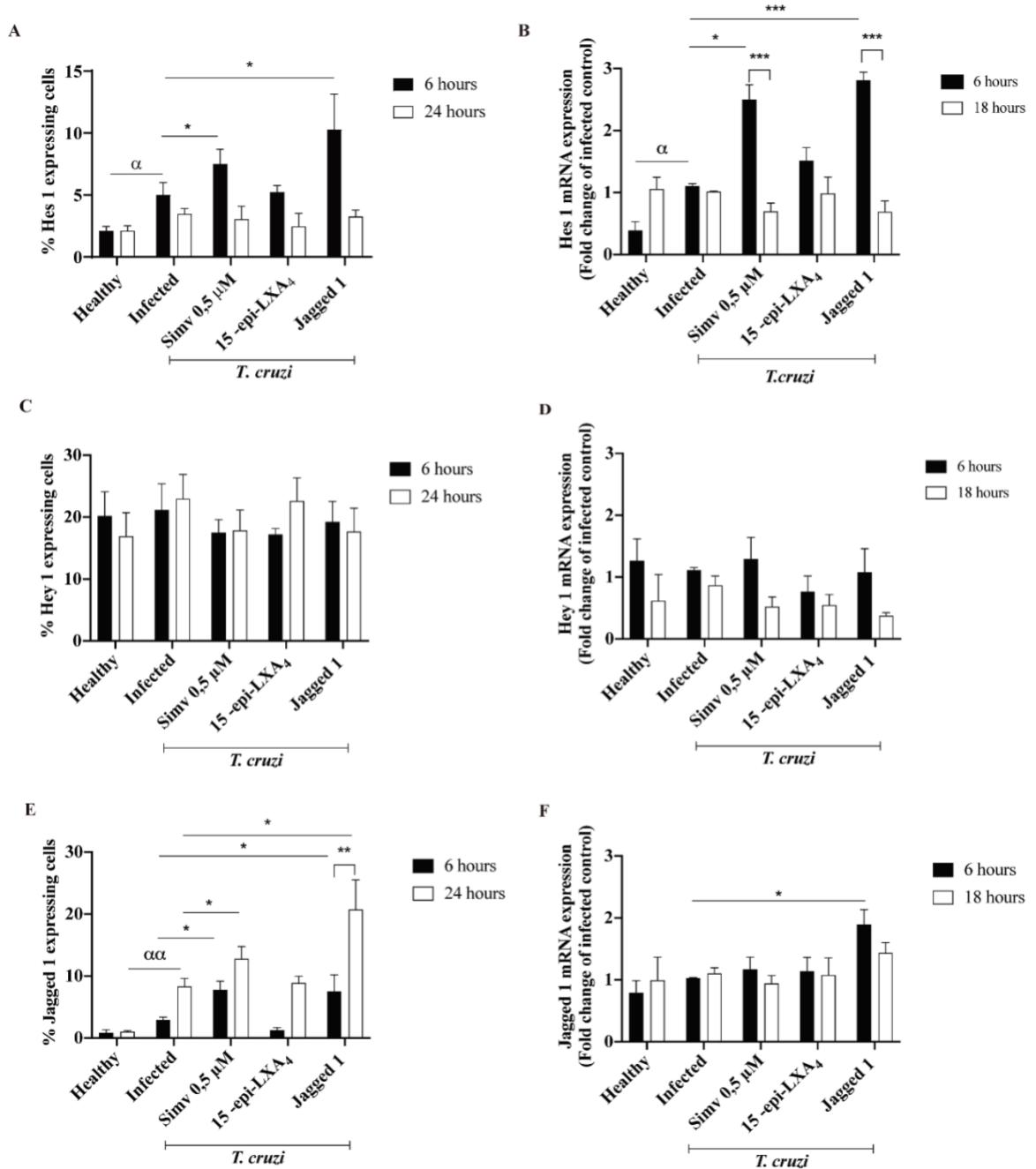
positivas para NICD. Los datos corresponden a 5 experimentos independientes y están expresados como el promedio  $\pm$  SEM. **B)**  $p \leq^{**} 0,01$  con respecto al control infectado, analizado por ANOVA de dos vías con post test de Bonferroni. **C)**  $* p \leq 0,05$  con respecto al control infectado;  $\alpha p \leq 0,05$  con respecto al control sano, analizado por ANOVA de una vía con post test de Dunnet.

La expresión de Hes 1, Hey 1 y de Jagged 1 indican la traslocación nuclear de NICD. Así, en la **Figura 3A** se puede apreciar como la infección con *T. cruzi* aumenta significativamente ( $p = 0,0129$ ) la cantidad de células HUVEC que expresan Hes 1, tempranamente (6 horas), aunque este no es un efecto sostenido. En presencia de la infección, el aumento en el número de células positivas para Hes 1 va en el mismo sentido que el incremento en la producción del correspondiente mRNA ( $p = 0,0095$ ; **Figura 3B**). Esta producción de mRNA no es sostenida en el tiempo si lo comparamos con el mRNA de Hes de las células infectadas a las 18 horas.

En nuestro modelo de estudio, ni la infección ni los tratamientos administrados modificaron la expresión de Hey 1 (**Figura 3C y 3D**). Por otro lado, la infección incrementa el número de células positivas para Jagged 1, aunque este efecto es más significativo a tiempos más tardíos de incubación ( $p = 0,0039$ , **Figura 3E**), aunque no haya diferencias en la producción de mRNA (**Figura 3F**).

Por otro lado, la simvastatina 0,5  $\mu$ M también tiene un efecto interesante sobre la vía de Notch, pues la cantidad de células HUVEC que expresan Hes 1 (**Figura 3A**) y que exponen Jagged 1 en la membrana (**Figura 3E**) es significativamente mayor a la producida por la infección con *T. cruzi* por si sola. Sin embargo, en el caso de Hes 1 ocurre sólo a tiempos tempranos, y en el caso de Jagged 1 la presentación está aumentada a las 6 horas y 24 horas. Además, al tratar las células infectadas con simvastatina, el mRNA de Hes 1 aumenta significativamente ( $p < 0,0001$ ), de la misma manera que ocurre con el control positivo.

La 15-epi-LXA<sub>4</sub> no modifica la expresión de Hes 1 ni de Jagged 1 (**Figura 3A-E**), lo cual se relaciona con el resultado anterior en el cual no aumenta la actividad de la vía (**Figura 2C**).

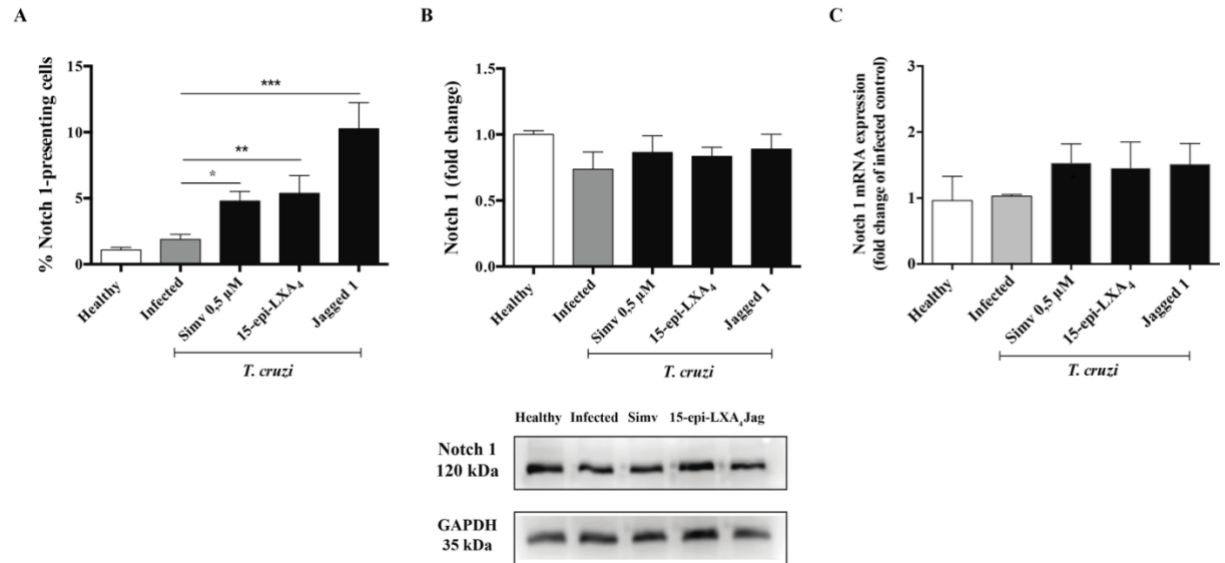


**Figura 3. La activación del receptor de Notch con simvastatina induce traslocación efectiva de NICD al núcleo de las células HUVEC infectadas con *Trypanosoma cruzi*.**

1 x 10<sup>5</sup> células HUVEC fueron infectadas con tripomastigotes de *T. cruzi* (Dm28c) durante 16 horas e incubadas con simvastatina 0,5 µM, 15-epi-LXA<sub>4</sub> 100 nM o Jagged 10 µM durante 6 y 24 horas. Análisis cuantitativo de la población celular positiva para **A)** Hes 1, **C)** Hey 1 y **E)** Jagged 1, las cuales se evaluaron a través de citometría de flujo. Determinación de la expresión de mRNA de **B)** Hes 1, **D)** Hey 1, y **F)** Jagged 1, después de 6 y 18 horas de incubación con los tratamientos indicados anteriormente, determinado a través de un ensayo de qPCR, utilizando GAPDH como gen constitutivo para la normalización de los valores. Los datos corresponden a 5 experimentos independientes y están expresados como el promedio ± SEM. \*  $p \leq 0,05$ ; \*\*\*  $\leq 0,001$  con respecto al control infectado,  $\alpha p \leq 0,05$   $\alpha\alpha \leq 0,01$  con respecto al control sano, analizado por ANOVA de dos vías con post test de Dunnet.

El aumento en el número de células HUVEC en las que se evidencia activación de la vía podría explicarse por un aumento en la presentación del receptor de Notch 1 en la superficie de la membrana. En efecto, al hacer un análisis cuantitativo de la población de células HUVEC positivas para el receptor de Notch 1, se aprecia que aumentan con la infección, aunque no significativamente al ser comparadas con las células sanas ( $p = 0,9371$ ; **Figura 4A**). Sin embargo, tras la incubación con simvastatina, este número aumenta significativamente. No obstante, estos cambios pueden ser debidos a un efecto sobre el reciclaje o en la expresión del mRNA del receptor. Así, cuando se analiza el contenido total del receptor, en la población total de células HUVEC, tampoco se apreciaron cambios significativos (**Figura 4B**). Igualmente, la expresión del mRNA para el receptor no presenta variaciones respecto del control infectado o las células sanas (**Figura 4C**).

De acuerdo con lo observado en la **Figura 4A**, la 15-epi-LXA<sub>4</sub> también afectaría la exposición de Notch de manera semejante a lo que hace simvastatina. Es decir, 15-epi-LXA<sub>4</sub> aumenta el número de células que exponen Notch 1 en su superficie ( $p = 0,0073$ ), sin modificar el contenido total de proteína o mRNA de Notch 1.

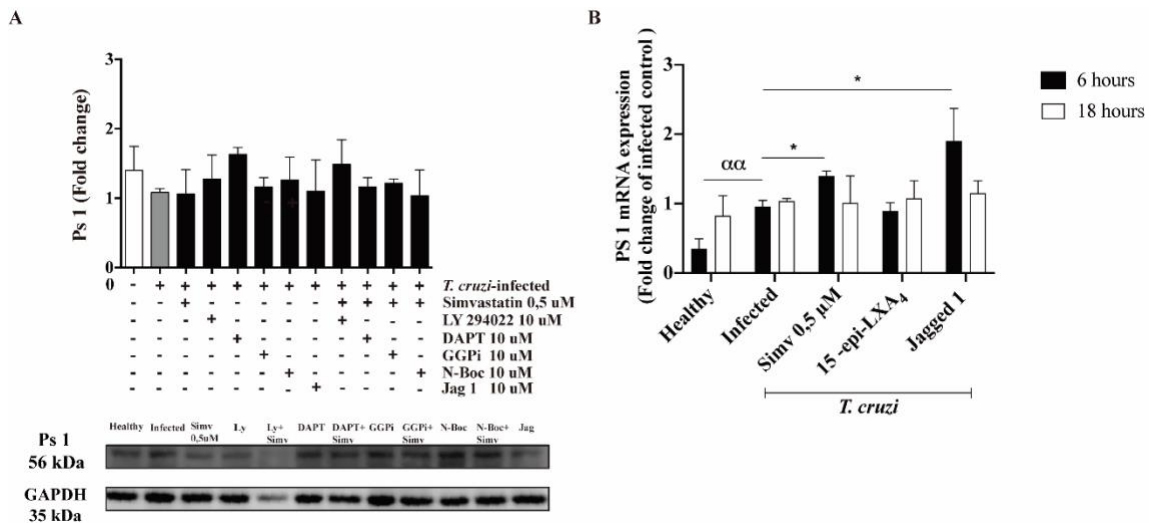


**Figura 4. Simvastatina aumenta el número de células HUVEC infectadas con *T. cruzi* que exponen el receptor Notch 1 en la superficie de la membrana.**

3 x 10<sup>5</sup> células HUVEC infectadas con tripomastigotes de *T. cruzi* (Dm28c) durante 16 horas y fueron incubadas con simvastatina 0,5 μM, 15-epi-LXA<sub>4</sub> 100 nM o Jagged 1 10 μM durante 6 horas. **A)** Población celular positiva para Notch 1, determinada por citometría de flujo usando IgG anti Notch 1 conjugado con APC. **B)** Proteína total de Notch 1, determinada por western blot, utilizando GAPDH como proteína constitutiva. El panel inferior corresponde a un blot representativo. **C)** RNA mensajero de NOTCH 1 evaluado por qPCR, utilizando GAPDH como gen constitutivo. Los datos corresponden a 5 experimentos independientes y están expresados como el promedio ± SEM. \*\*\*  $p \leq 0,001$ ; \*\*  $\leq 0,01$ ; \*  $\leq 0,05$  con respecto al control infectado analizado por ANOVA de una vía con post test de Dunnett.

Dado que la presenilina 1 (Ps1) es central en el proceso de activación del receptor de Notch, se evaluó el efecto de simvastatina sobre esta proteasa. En primer lugar, se evaluó si había modificaciones en la proteína total con la infección o con los tratamientos estudiados en combinación de distintos inhibidores, como DAPT, un

inhibidor directo de Ps1. Además, se ha descrito que la modificación de geranilgeranil pirofosfato, afecta directamente a la proteína G pequeña Rho y ésta modifica Ps1, por lo tanto, también se utilizó esta molécula. Simvastatina aumenta la vía de PI3K, la cual podría tener un *cross-talk* con la vía de Notch 1, por lo que se utilizó el inhibidor de PI3K, LY294022. En efecto, la expresión de la proteína total no varía (aun cuando se puede apreciar una ligera variación en el contenido de mRNA a las 6 horas de incubación) ni con la infección con *T. cruzi* ni con los distintos tratamientos aplicados, sea simvastatina o los inhibidores de su actividad o de la actividad de otros componentes de vías que podrían influir sobre esta enzima (**Figura 5A y 5B**), por lo que sólo se observa que la simvastatina podría alterar sólo la actividad de presenilina y de esta forma, la activación de la vía de Notch 1 como se observa en la **Figura 2**.



**Figura 5. La señalización de Notch 1 se activa por simvastatina a través del aumento de presenilina 1 en células HUVEC infectadas con *T. cruzi*.**

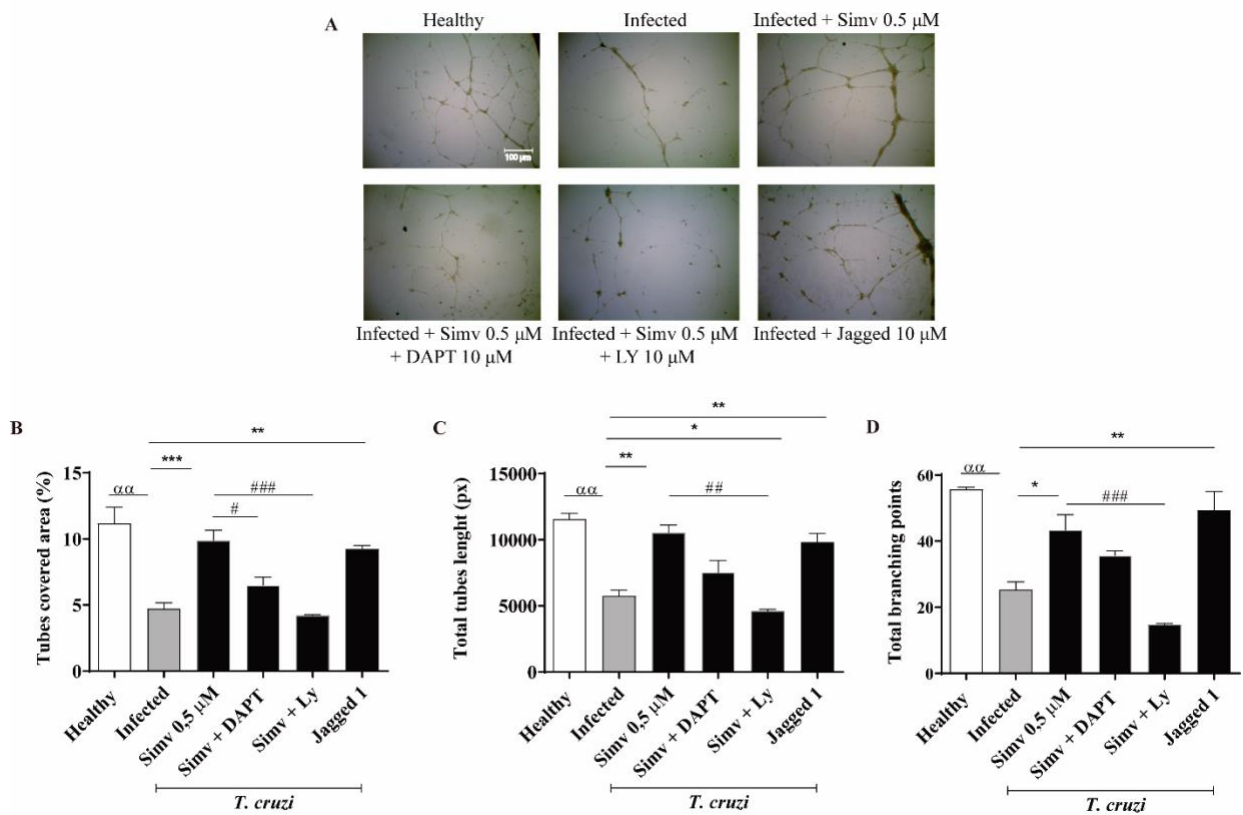
3 x 10<sup>5</sup> células HUVEC infectadas con tripomastigotes de *T. cruzi* (Dm28c) durante 16 horas y fueron incubadas con simvastatina 0,5 μM, 15-epi-LXA<sub>4</sub> 100 nM o Jagged 1 10 μM, LY294022 10 μM, DAPT 10 μM, geranilgeranil pirofosfato (GGPi) 10 μM y N-Boc 10 μM durante 24 horas. **A)** Proteína total de presenilina 1, la cual se evaluó a través de western blot, utilizando GAPDH como proteína constitutiva. El panel inferior corresponde a un blot representativo. **B)** RNA mensajero de



PS1 evaluado por qPCR a 6 y 18 horas, utilizando GAPDH como gen constitutivo. Los datos corresponden a 5 experimentos independientes y están expresados como el promedio  $\pm$  SEM. \*  $p \leq 0,05$  con respecto al control infectado, ***aa***  $p \leq 0,01$  con respecto al control sano, analizado por ANOVA de dos vías con post test de Dunnet.

### **Simvastatina recupera la capacidad angiogénica de células HUVEC infectadas con *T. cruzi***

Para evaluar funcionalmente el impacto que tiene simvastatina sobre las células HUVEC y el rol de la vía de Notch 1 en este proceso, se realizó un ensayo de angiogénesis. Así, al cultivar las células HUVEC en matrigel, se apreció disminución de la angiogénesis en presencia del parásito (**Figura 6**), pero simvastatina fue capaz de recuperar esta funcionalidad, tanto en el área cubierta por tubos (**Figura 6A**), así como en la longitud de los tubos formados tras 24 horas de incubación (**Figura 6B**) y en el número de ramificaciones (**Figura 6C**). Es interesante observar en este experimento que al inhibir Ps1 con DAPT, los parámetros funcionales de angiogénesis disminuyen significativamente con respecto a simvastatina ( $p = 0,0333$ ), aunque el efecto es más marcado con el inhibidor de PI3K, lo que sugiere que ambas vías, Notch 1 y PI3K son necesarias para la formación de tubos.



**Figura 6. Simvastatina aumenta la formación de estructuras tubulares mediado por Notch 1 en células HUVEC infectadas con *T. cruzi*.**

1 x 10<sup>4</sup> células HUVEC fueron infectadas con 1 x 10<sup>5</sup> tripomastigotes de *T. cruzi* (Dm28c) durante 16 horas. Posteriormente, las células fueron transferidas a cámaras Lab-tek II con matrigel y tratadas con simvastatina 0,5 μM, Jagged 1, DAPT 10 μM y Ly294022 10 μM durante 24 horas a 37 °C. **A)** Panel representativo de la formación de tubos sobre matrigel observados con microscopio Motic BA310 acoplado con cámara 5,0 MP Moticam. Cuantificación de **B)** área cubierta por los tubos, **C)** largo de los tubos en pixeles y **D)** puntos de ramificación usando el software Wimasis para el análisis cuantitativo de las imágenes. Los datos corresponden a 3 experimentos independientes y están expresados como el promedio ± SEM. \*\*\*  $p \leq 0,001$ ; \*\*  $\leq 0,01$ ; \*  $\leq 0,05$  con respecto al control infectado,  $\alpha\alpha\alpha p \leq 0,001$ ;  $\alpha\alpha \leq 0,01$  con respecto al control sano;  $\#\#\# p \leq 0,001$ ;  $\#\# \leq 0,01$ ;  $\# \leq 0,05$  con respecto a *T. cruzi* + simvastatina, analizado por ANOVA de una vía con post test de Tukey.

En resumen, los resultados mostrados hasta el momento sugieren que la infección con *T. cruzi* es capaz de activar la vía de Notch 1. Adicionalmente, la simvastatina,

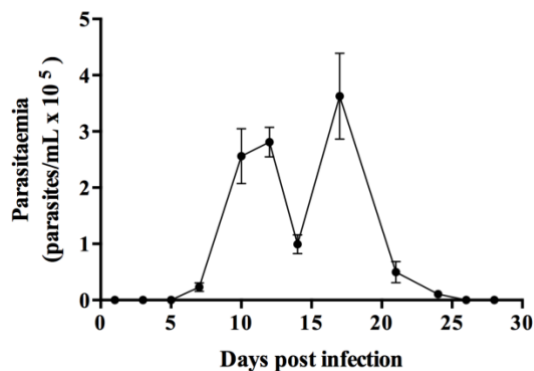
a concentración de 0,5  $\mu$ M, aumenta la actividad de la vía y, aparentemente, también la exposición del receptor Notch 1. Sin embargo, la administración de 15-epi-lipoxina A<sub>4</sub> a concentración de 100 nM, aunque aumentó la exposición del receptor, no evidenció efectos sobre la actividad de la vía de Notch 1, por lo que el efecto de simvastatina podría ser independiente de la generación de este mediador; probablemente, a través de la actividad de Ps1. Además, desde el punto de vista funcional, la activación de Notch 1 por simvastatina recupera la actividad angiogénica previamente inhibida por el *T. cruzi* en células HUVEC, en un mecanismo que involucra tanto a Notch 1 como a PI3K.

**OBJETIVO 2:** Evaluar el efecto de simvastatina en un modelo murino infectado crónicamente por *T. cruzi* sobre Notch 1 determinando niveles de expresión y activación del receptor.

El modelo celular estudiado *in vitro* previamente descrito, presenta un modelo agudo y unicelular de infección con *T. cruzi*, por lo que no refleja exactamente lo que ocurre durante la infección crónica en el hospedero mamífero. Por esta razón, se evaluó el efecto de la simvastatina en un modelo murino de infección crónica con *Trypanosoma cruzi*. Para ello, se infectaron ratones BALB/c con tripomastigotes de *T. cruzi*, los cuales fueron sometidos a tratamiento con simvastatina o con DAPT, un inhibidor de la vía de Notch 1, durante la fase crónica de la infección. Para verificar el efecto farmacológico de este tratamiento se evaluaron parámetros de función cardíaca, el efecto final en el tejido cardíaco, evaluando la actividad de la vía de Notch 1 y también, el efecto sobre la inflamación y la fibrosis miocárdica.

### **Validación del modelo de infección crónica en ratones BALB/c**

Para seguir el curso de la infección, se siguió el curso de la parasitemia, mediante visualización al microscopio de luz, en sangre periférica hasta cuando los parásitos se hicieron indetectables (**Figura 7**). El patrón de parasitemia observado es el característico para la cepa Dm28c (Molina-Berrios et al. 2013). Los parásitos se hicieron indetectables hacia el día 25, con lo que se puede afirmar que los animales entraron a la fase crónica de la infección. Sin embargo, para asegurar que los tratamientos se administraron durante la fase crónica, los animales se trataron a partir del día 60 p.i.



**Figura 7. Parasitemia en ratones BALB/c infectados con *T. cruzi*.**

Los ratones BALB/c fueron infectados intraperitonealmente con 1000 tripomastigotes de *T. cruzi* Dm28c. La parasitemia se evaluó desde el día 3 post-infección por el método de la gota gruesa, utilizando sangre de la cola para cuantificar los parásitos en el microscopio. El gráfico corresponde al promedio de parásitos/mL  $\pm$  SEM de las parasitemias de 9 individuos.

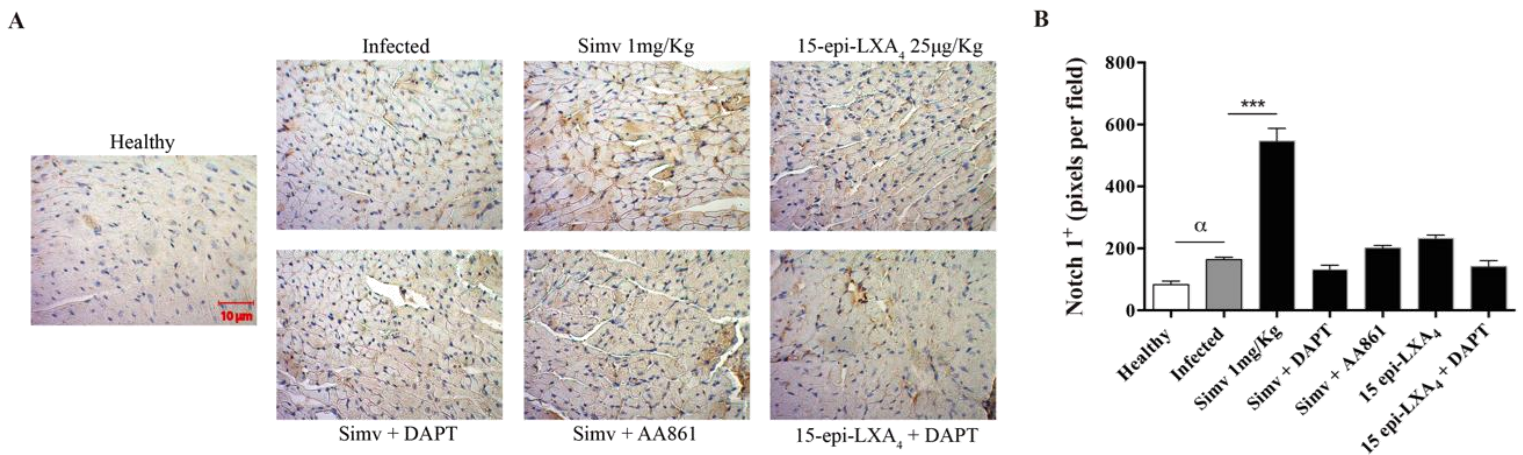
### **La simvastatina aumenta la expresión y activación de Notch 1 en ratones infectados crónicamente con *T. cruzi***

Para determinar el efecto de simvastatina sobre la vía de señalización de Notch en el corazón del modelo murino de infección crónica con *T. cruzi*, se determinó, mediante inmunohistoquímica, la presencia del receptor (**Figura 8**), su dominio intracelular libre (**Figura 9**) y la expresión de Hes 1 (**Figura 10**) en el tejido cardíaco.

En concordancia con los resultados observados *in vitro* en células HUVEC, la inmunorreactividad a Notch 1 en tejido cardíaco está aumentada en presencia de la infección crónica con *T. cruzi* (**Figura 8**). Sin embargo, se observa una reactividad alta, pero difusa, y significativamente mayor ( $p < 0,0001$ ) a la observada en los tejidos infectados o con los otros tratamientos en los corazones de ratones tratados con simvastatina a una dosis de 1 mg/Kg/día. Considerando que la marca para Notch 1 es muy difusa, los resultados se expresaron en función del número de

píxeles, correspondientes a la inmunorreactividad, por campo evaluado. Interesantemente, la presencia del receptor de Notch 1 disminuye en presencia del inhibidor de la  $\gamma$ -secretasa, llevándolo a valores semejantes a los observados con la infección con *T. cruzi*. Adicionalmente, y contrario a lo observado en el modelo *in vitro*, el efecto de 15-epi-LXA<sub>4</sub> sobre la presencia de Notch no fue diferente a la de los animales infectados, sugiriendo que este mediador no intermedia el efecto de la simvastatina sobre el sistema de Notch 1.

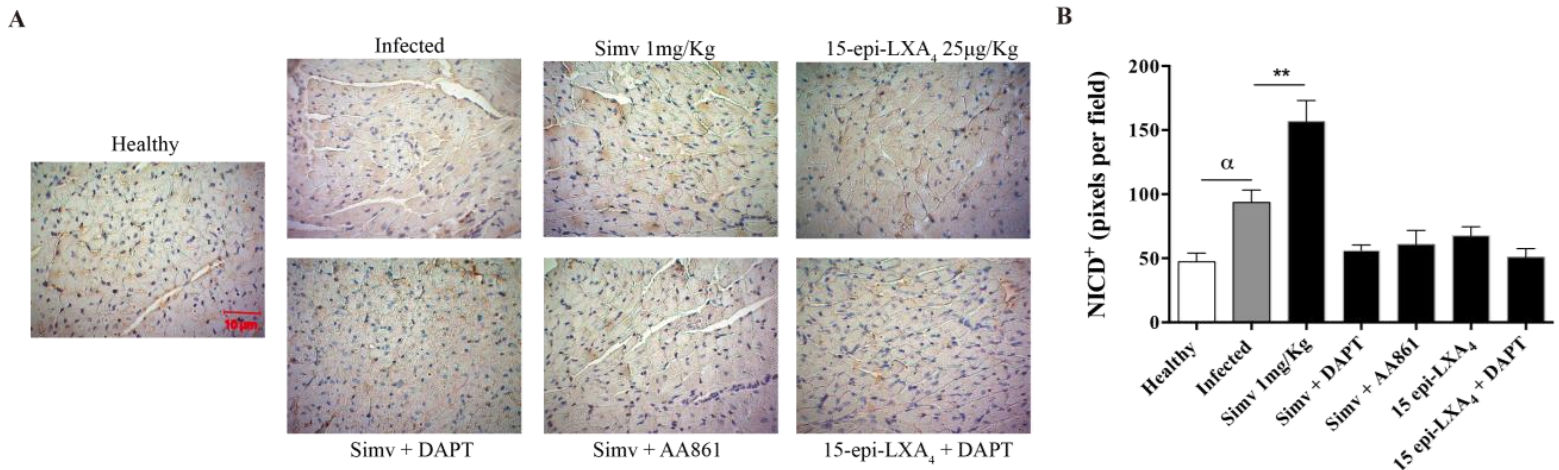
La simvastatina no solo aumenta la cantidad del receptor Notch 1 en el tejido cardiaco, sino que además promueve la activación de la vía. Como se puede apreciar en la **Figura 9B**, la inmunorreactividad para NICD esta aumentada tanto por el efecto de la infección con *T. cruzi*, como por la administración de simvastatina, siendo este último un efecto significativamente mayor al de la infección ( $p = 0,0019$ ). Lo mismo ocurre cuando se cuantifica la inmunorreactividad para Hes 1 (**Figura 10B**). Los resultados anteriores permiten concluir que simvastatina es capaz de activar la vía de Notch en la cardiopatía chagásica crónica, independientemente de la producción de 15-epi-LXA<sub>4</sub>.



**Figura 8. Simvastatina aumenta la expresión de Notch 1 en animales crónicamente infectados con *T. cruzi*.**

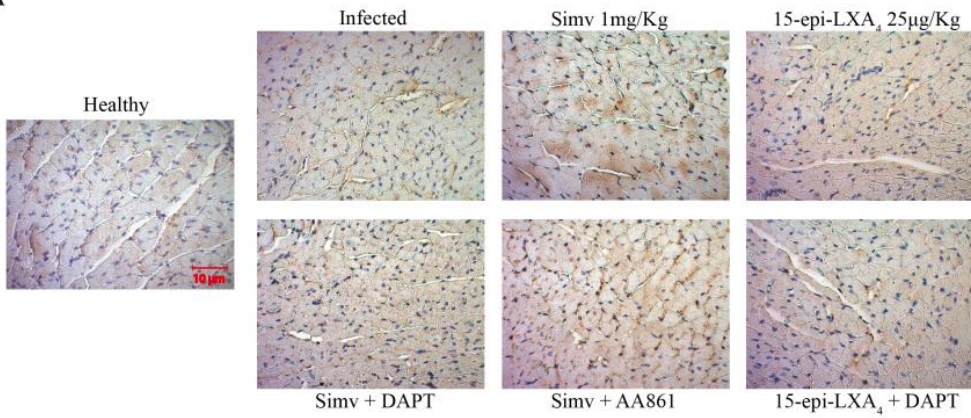
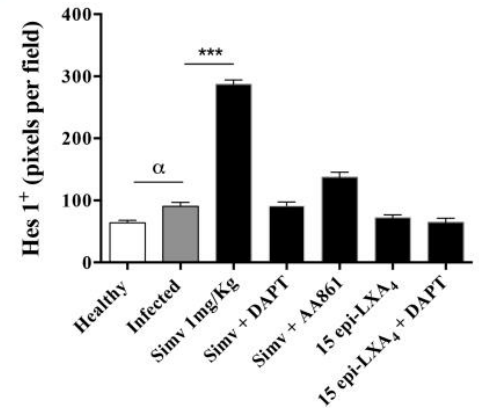
Los ratones BALB/c fueron infectados con  $1 \times 10^3$  tripomastigotes de *T. cruzi* y tratados durante 20 días a partir del día 60 postinfección. El tratamiento duró 20 días, al término de los cuales los

animales fueron eutanasiados y los corazones sometidos a inmunohistoquímica. **A)** Imágenes representativas de tejido cardíaco teñidas por inmunohistoquímica usando anti Notch 1 (1:200) como anticuerpo primario y tinción de hematoxilina para el contraste. **B)** Los datos corresponden a la determinación del promedio de pixeles  $\pm$  SEM de 5 campos por animal, (n= 5). \*\*\*  $p \leq 0,001$  con respecto al control infectado,  $\alpha$   $p \leq 0,05$  con respecto al control sano, analizado por ANOVA de una vía con post test de Dunnet.



**Figura 9. Simvastatina aumenta la activación de Notch 1 en animales crónicamente infectados con *T. cruzi*.**

Los ratones BALB/c fueron infectados con  $1 \times 10^3$  tripomastigotes de *T. cruzi* y tratados durante 20 días a partir del día 60 postinfección. El tratamiento duró 20 días, al término de los cuales los animales fueron eutanasiados y los corazones sometidos a inmunohistoquímica. **A)** Imágenes representativas de tejido cardíaco teñidas por inmunohistoquímica usando anti NICD (1:100) como anticuerpo primario y tinción de hematoxilina para el contraste. **B)** Los datos corresponden a la determinación del promedio de pixeles  $\pm$  SEM de 5 campos por animal, (n= 5). \*\*\*  $p \leq 0,001$  con respecto al control infectado,  $\alpha$   $p \leq 0,05$  con respecto al control sano, analizado por ANOVA de una vía con post test de Dunnet.

**A****B**

**Figura 10. Simvastatina aumenta la activación de Notch 1 a través de Hes 1 en animales crónicamente infectados con *T. cruzi*.**

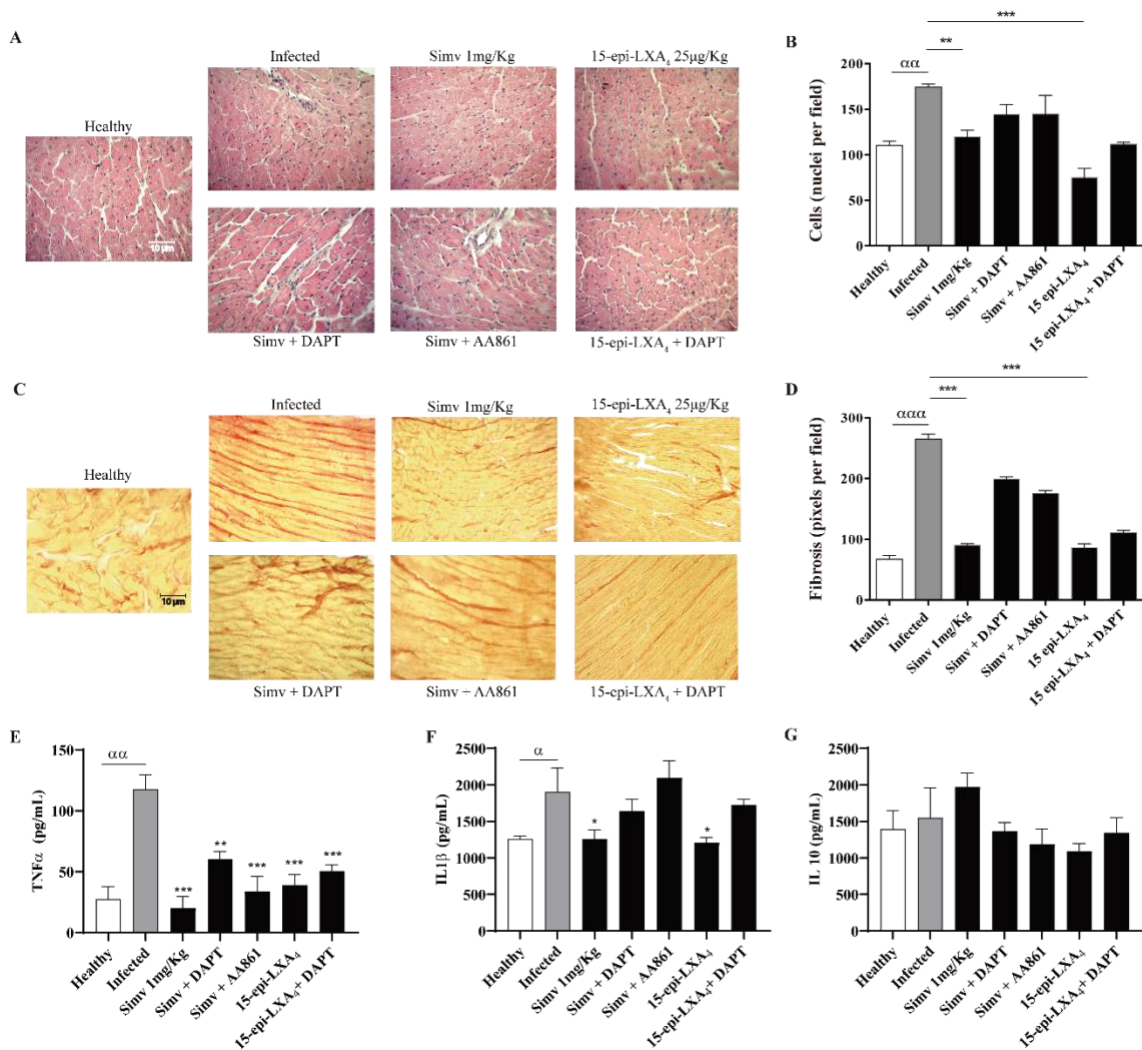
Los ratones BALB/c fueron infectados con  $1 \times 10^3$  tripomastigotes de *T. cruzi* y tratados durante 20 días a partir del día 60 postinfección. El tratamiento duró 20 días, al término de los cuales los animales fueron eutanasiados y los corazones sometidos a inmunohistoquímica. **A)** Imágenes representativas de tejido cardíaco teñidas por inmunohistoquímica usando anti Hes 1 (1:200) como anticuerpo primario y tinción de hematoxilina para el contraste. **B)** Los datos corresponden a la determinación del promedio de píxeles  $\pm$  SEM de 5 campos por animal, (n= 5). \*\*\*  $p \leq 0,001$  con respecto al control infectado,  $\alpha$   $p \leq 0,05$  con respecto al control sano, analizado por ANOVA de una vía con post test de Dunnett.



**OBJETIVO 3:** Evaluar el efecto de Notch 1 modulado por simvastatina en el modelo murino infectado en la sobrevida, función y remodelado cardíaco.

**Simvastatina, a través de la activación de Notch 1, revierte el remodelado cardíaco en animales infectados crónicamente con *T. cruzi***

Parte del proceso fisiopatológico que explica la disminución de la función cardíaca en la enfermedad de Chagas está relacionado con remodelamiento de la pared ventricular, producto del reemplazo de tejido miocárdico por depósitos de matriz extracelular colagenosa, con la consecuente fibrosis. Sin embargo, el desarrollo de fibrosis es la consecuencia final de un prolongado proceso inflamatorio inducido por la persistencia del parásito. En efecto, a los 80 días p.i., la infección con *T. cruzi* provocó desorganización de la arquitectura miocárdica, e indujo un intenso infiltrado inflamatorio en los ratones estudiados (**Figura 11A-B**). La simvastatina ( $p = 0,009$ ), y también la 15-epi-LXA<sub>4</sub> ( $p < 0,0001$ ), mejoraron significativamente el infiltrado celular. El efecto que tiene la vía de Notch 1 sobre el infiltrado celular del miocardio chagásico parece estar opacado por la actividad antiinflamatoria de simvastatina, que actúa a través de 15-epi-LXA<sub>4</sub>, como ocurre cuando se añade el inhibidor de 5-LO, AA861. No obstante, la adición del inhibidor de presenilina 1 previene (aunque no significativamente) el aclaramiento del infiltrado inflamatorio (**Figura 11A-B**).



**Figura 11. Simvastatina y 15-epi-LXA<sub>4</sub> atenúan el daño en tejido cardíaco y la fibrosis de animales crónicamente infectados con *T. cruzi*.**

Los ratones BALB/c fueron infectados con  $1 \times 10^3$  tripomastigotes de *T. cruzi* y tratados durante 20 días a partir del día 60 postinfección. El tratamiento duró 20 días, al término de los cuales los animales fueron eutanasiados y los corazones sometidos a análisis histológico. **A)** Imágenes representativas de tejido cardíaco teñidas por hematoxilina-eosina. **B)** Cuantificación de la celularidad determinada por la cantidad de núcleos presentes en el tejido de acuerdo con el análisis efectuado usando el software Image J. **C)** Imágenes representativas de tejido cardíaco teñidas por rojo picrosirio. **D)** Cuantificación del proceso fibrótico a través de la cantidad de píxeles para la coloración en rojo. Las imágenes **A-C** son representativas de cinco campos por animal. Los datos corresponden a los corazones de cinco animales y están expresados como el promedio de núcleos o

pixeles  $\pm$  SEM. **E-G**) Concentración de **E**) TNF- $\alpha$ , **F**) IL-1 $\beta$ , y **G**) IL-10 en el suero de ratones BALB/c infectados evaluados a través de la determinación por ELISA. \*\*\*  $p \leq 0,001$ ; \*\*  $\leq 0,01$ ; \*  $\leq 0,05$  con respecto al control infectado,  $\alpha\alpha\alpha p \leq 0,001$ ;  $\alpha\alpha \leq 0,01$ ;  $\alpha^* \leq 0,05$  con respecto al control sano, analizado por ANOVA de una vía con post test de Dunnet.

Como se mencionó, la fibrosis implica el avance a etapas terminales en la cardiopatía y puede, eventualmente conllevar a alteraciones irreversibles, que en el humano son corregidas únicamente con el trasplante. En efecto, la infección en ratones provocó un proceso fibrótico evidenciado por el depósito anormalmente alto de colágeno en el músculo cardíaco (**Figura 11C**), y tanto simvastatina como 15-epi-LXA<sub>4</sub> fueron capaces de prevenir su aparición.

Además, el efecto de ambos fármacos fue revertido por sus correspondientes inhibidores, DAPT y AA861, respectivamente. Interesantemente, la fibrosis observada en presencia de la inhibición de la vía de Notch 1 es similar a la observada con la inhibición en la producción de 15-epi-LXA<sub>4</sub> (**Figura 11D**), sugiriendo que el efecto de simvastatina podría ser complejo, involucrando tanto a Notch como a 15-epi-LXA<sub>4</sub>. En todo caso, como la actividad de 15-epi-LXA<sub>4</sub> no fue afectada por la presencia de DAPT, es posible que el efecto de este mediador no involucre la señalización de Notch, en concordancia con lo sugerido por otros resultados del presente estudio.

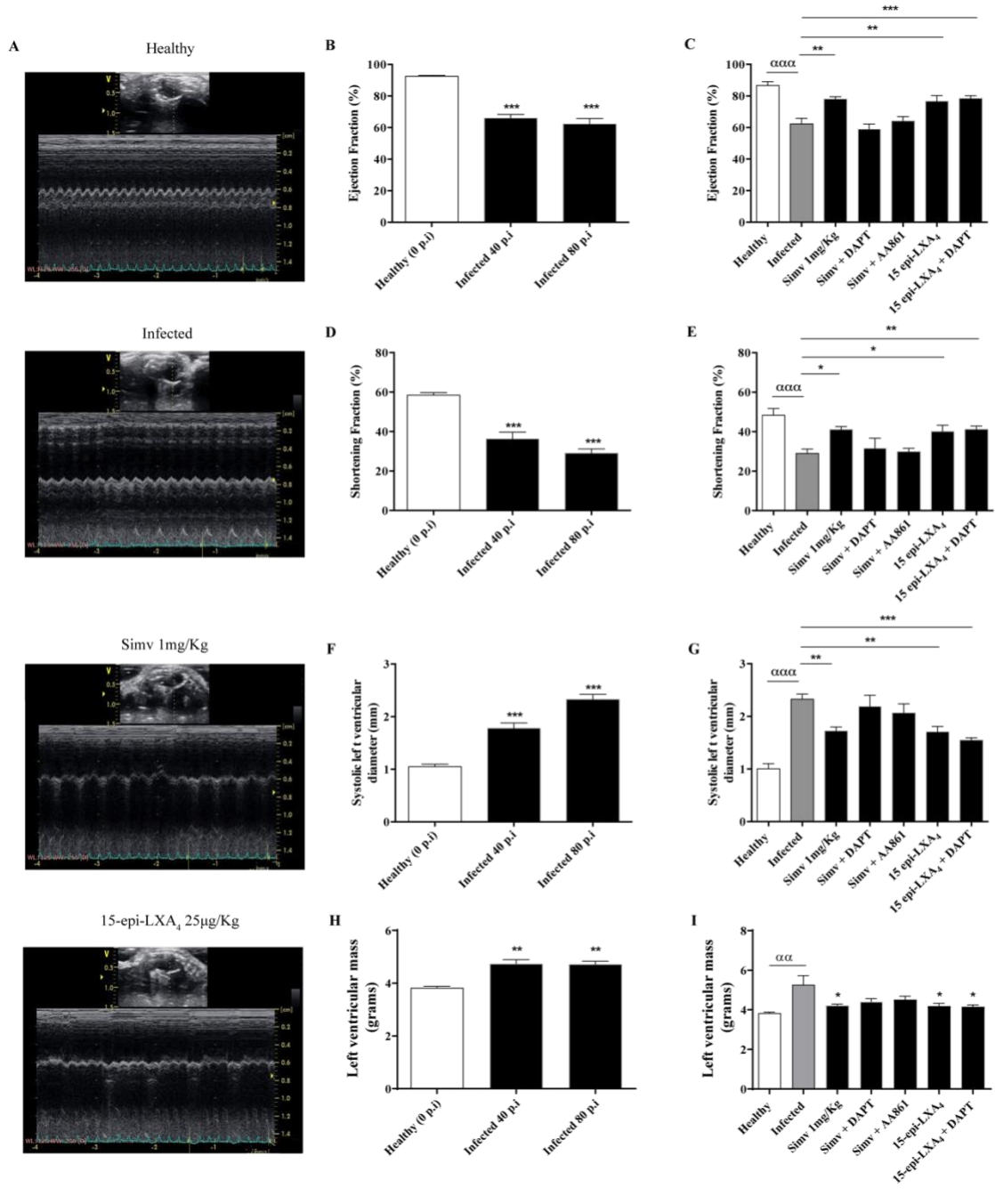
Como se muestra en la **Figura 11 E-G**, tanto TNF- $\alpha$  e IL-1 $\beta$  aumentaron con la infección por *T. cruzi*, cosa que no ocurre con IL-10. Sin embargo, el tratamiento con simvastatina disminuyó las citoquinas proinflamatorias. De manera interesante, cuando se agregó DAPT, la intensidad en la disminución de la producción de TNF- $\alpha$  con simvastatina fue menor, sugiriendo un papel de Ps 1, y por tanto de Notch 1, en este efecto. La 15-epi-LXA<sub>4</sub> disminuyó TNF- $\alpha$  e IL-1 $\beta$  y la inhibición de 5-LOX revirtió parcialmente el efecto de la 15-epi-LXA<sub>4</sub> sobre TNF- $\alpha$  e IL-1 $\beta$  (**Figura 11E-F-G**), lo que es esperable para esta molécula antiinflamatoria.

## **Simvastatina a través de la activación de Notch 1 revierte el daño de la función cardíaca en animales crónicamente infectados con *T. cruzi***

Dado que la fibrosis disminuyó con el tratamiento con simvastatina, es posible suponer que esta acción impacte también favorablemente en la función cardíaca, la que se evaluó mediante ecocardiografías bidimensionales, tomando un estado basal antes de provocar la infección y a los días 40 y 80 p.i. Los parámetros ecocardiográficos obtenidos fueron la fracción de eyección (FE), que es un marcador de función cardíaca y de valor pronóstico en cardiopatías dilatadas (Ribeiro et al. 2012), fracción de acortamiento (FA), diámetro del ventrículo izquierdo en sístole (DVIS) y masa del ventrículo izquierdo.

En la **Figura 12** se presenta la evaluación del efecto de simvastatina o 15-epi-LXA<sub>4</sub> sobre la función cardíaca. La fracción de eyección (FE) en ratones sanos fue de  $92,5 \pm 0,64\%$  (**Figura 12B**), valor que no presentó variaciones durante todo el experimento. Por otro lado, la infección con *T. cruzi* provocó una significativa disminución en este parámetro a partir del día 40 p.i (FE= $66,1 \pm 2,32\%$ ;  $p < 0,0001$ ). En la **Figura 12C** se puede apreciar que, al tratar con simvastatina, se produjo una ligera, pero significativa recuperación de la FE (FE= $78,0 \pm 1,58\%$ ;  $p = 0,0024$ ). Más aún, la fracción de eyección también se recuperó con 15-epi-lipoxina A<sub>4</sub> (FE= $76,67 \pm 3,65\%$ ;  $p=0,0037$ ; **Figura 12C**). Este último hallazgo es esperable por cuanto también disminuyó significativamente la fibrosis (**Figura 11D**); lo que está en consonancia con resultados previos que demostraron que este mediador interviene en la acción de simvastatina como antiinflamatorio en la cardiopatía chagásica murina (Gonzalez-Herrera et al. 2017). Por lo demás, cuando se combinó la simvastatina con un inhibidor de Ps1, la fracción de eyección se mantuvo igual a la de los corazones infectados, sugiriendo el compromiso de la vía de Notch 1 en el efecto benéfico de simvastatina sobre la FE. Por otra parte, la adición de DAPT al tratamiento con 15-epi-LXA<sub>4</sub> fue inefectiva en modificar el valor de FE, sugiriendo que el efecto de la 15-epi-LXA<sub>4</sub> no está relacionado con la vía de Notch.

Los otros parámetros de función cardíaca, FA y DVIS, presentaron variaciones similares a la observada con la FE (**Figura 12D-F**). Es importante añadir que el DVIS aumenta progresivamente con la infección, en concordancia con el desarrollo de una cardiopatía dilatada (**Figura 12F**). Sin embargo, este diámetro disminuye significativamente con simvastatina ( $p = 0,0075$ ) al día 80 p.i (**Figura 12G**). Aunque la FE es un indicador pronóstico en la cardiomiopatía dilatada, el valor de DVIS permite establecer una relación con la mejoría estructural en el tejido miocárdico evidenciado por la disminución en la fibrosis y también por la disminución significativa de la inflamación. El aumento de la masa del ventrículo izquierdo durante la infección, indicativo de hipertrofia (**Figura 12H**) disminuye con la simvastatina y con 15-epi-LXA<sub>4</sub>. Para todos los parámetros observados, DAPT afecta los efectos obtenidos con simvastatina; sin embargo, los efectos benéficos de 15-epi-LXA<sub>4</sub> no se revierten con DAPT.

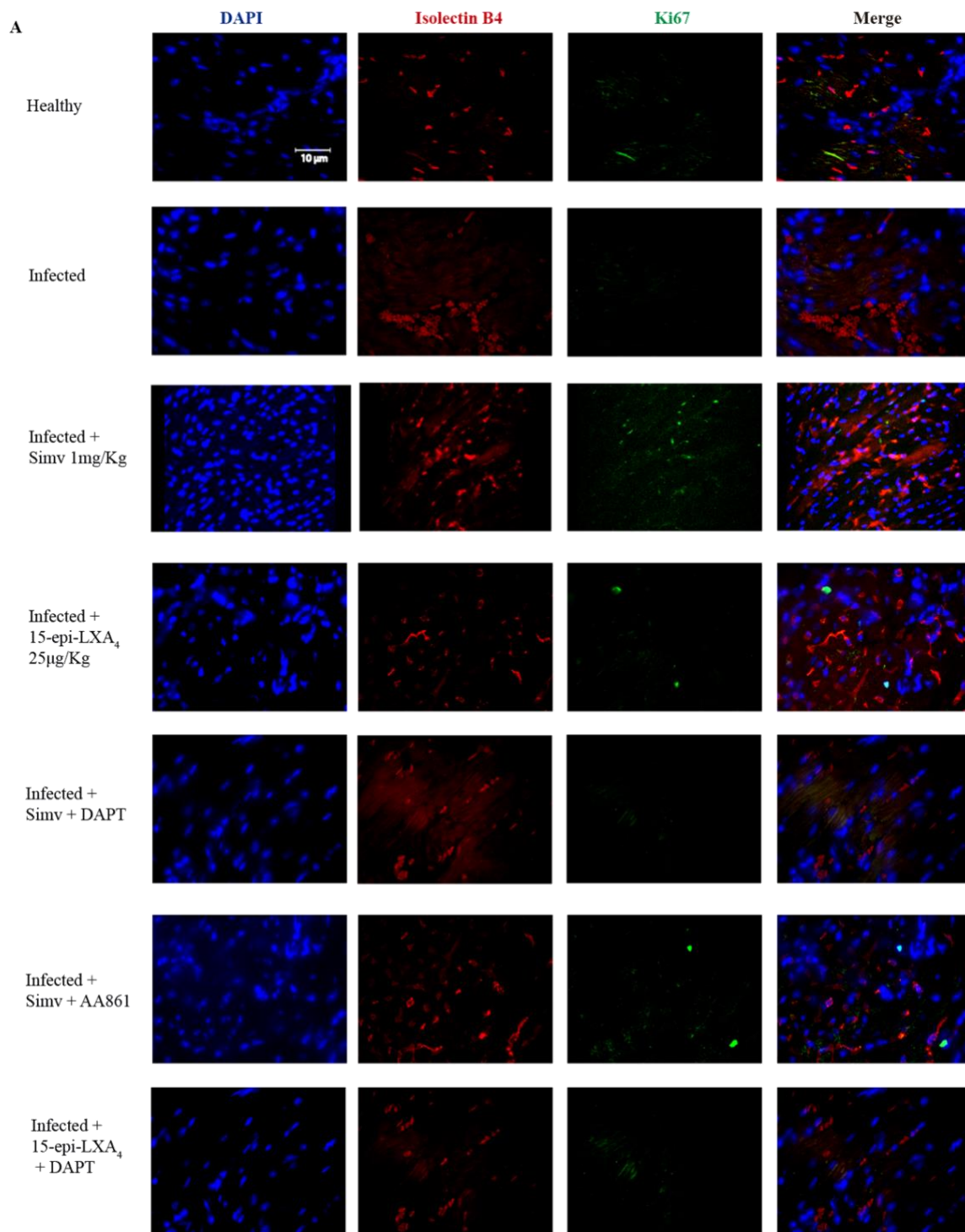


**Figura 12. Simvastatina normaliza la funcionalidad cardíaca en ratones BALB/c crónicamente infectados con *T. cruzi*.**

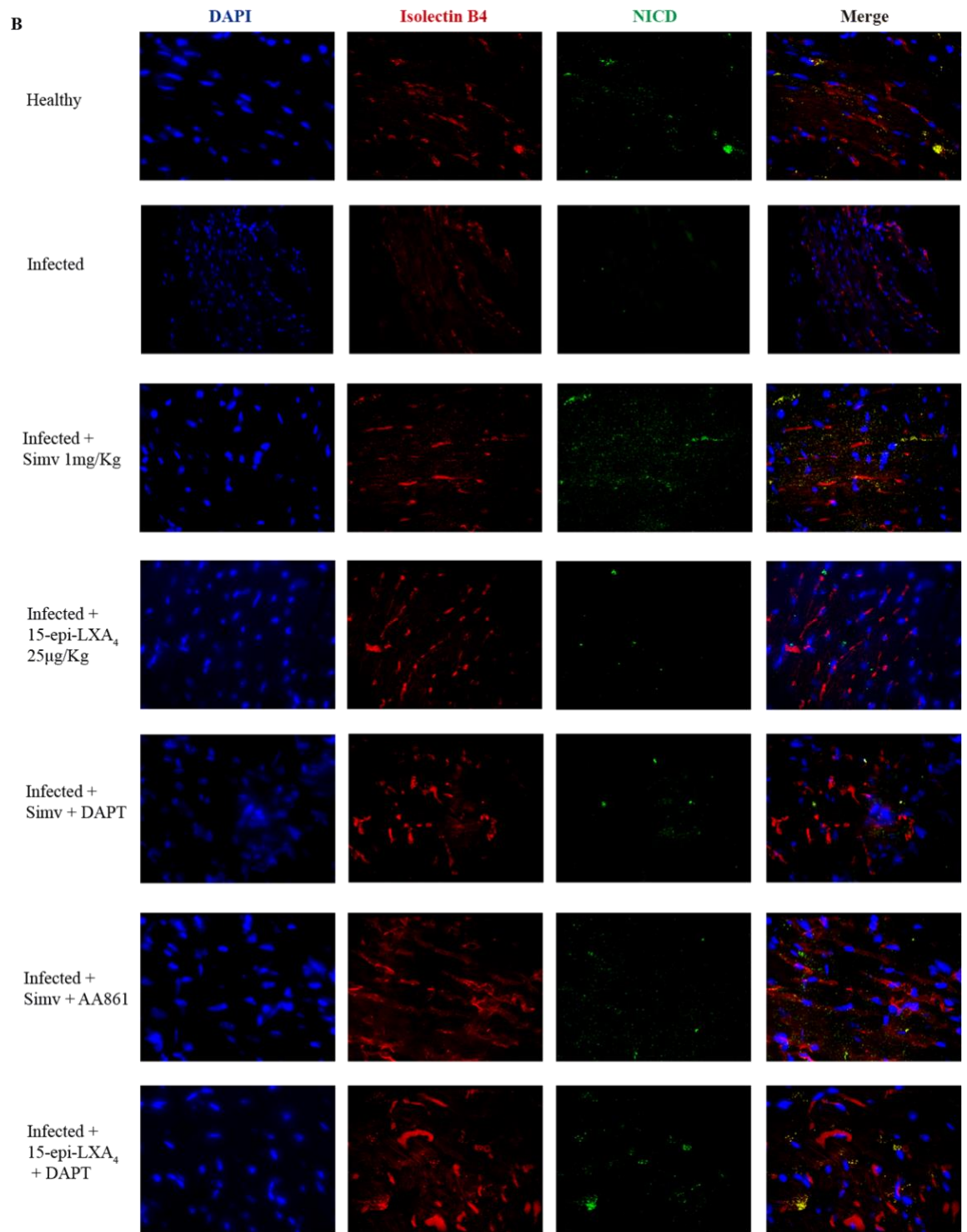
Los ratones fueron infectados con  $1 \times 10^3$  tripomastigotes de *T. cruzi* y al día 40, 60 y 80 fueron sedados ligeramente para realizar una ecocardiografía bidimensional con un transductor iRL- RS de

13 MHz en un ecocardiógrafo Vivid i®. **A)** Imágenes representativas de las ecocardiografías al día 80 p.i. para ratones sanos, infectados y tratados con simvastatina o 15-epi-LXA4. Comparación de la fracción de eyección (**B**), fracción de acortamiento (**D**), diámetro sistólico del ventrículo izquierdo (**F**) y masa del ventrículo izquierdo (**H**) al inicio del experimento, al día 40 y al día 80 p.i. Evaluación del efecto de los tratamientos indicados al día 80 p.i. sobre la fracción de eyección (**C**), fracción de acortamiento (**E**), diámetro sistólico del ventrículo izquierdo (**G**) y masa del ventrículo izquierdo (**I**). **B-D-F-H** \*\*\*  $p \leq 0,001$ ; \*\*  $\leq 0,01$  con respecto al control sano. **C-E-G-I** \*\*\*  $p \leq 0,001$ ; \*\*  $p \leq 0,01$ ; \*  $p \leq 0,05$  con respecto a control infectado,  $\alpha\alpha\alpha p \leq 0,001$  con respecto al control sano analizado por ANOVA de una vía y post test de Dunnet.

En los ratones tratados con simvastatina se observó que había proliferación celular, predominantemente en células endoteliales, tal y como muestra la colocalización de la marca de Ki67 con las células positivas para isolectina B4, que corresponderían a las células endoteliales (**Figura 13A**); situación no observada con la administración de 15-epi-LXA4. Por lo demás, en los ratones tratados con simvastatina la marca de NICD colocalizó predominantemente en las células endoteliales (**Figura 13B**). Aunque es posible ver alguna señal en el tejido de los ratones a los que se administró el inhibidor de Ps 1, la influencia de la simvastatina fue más evidente.





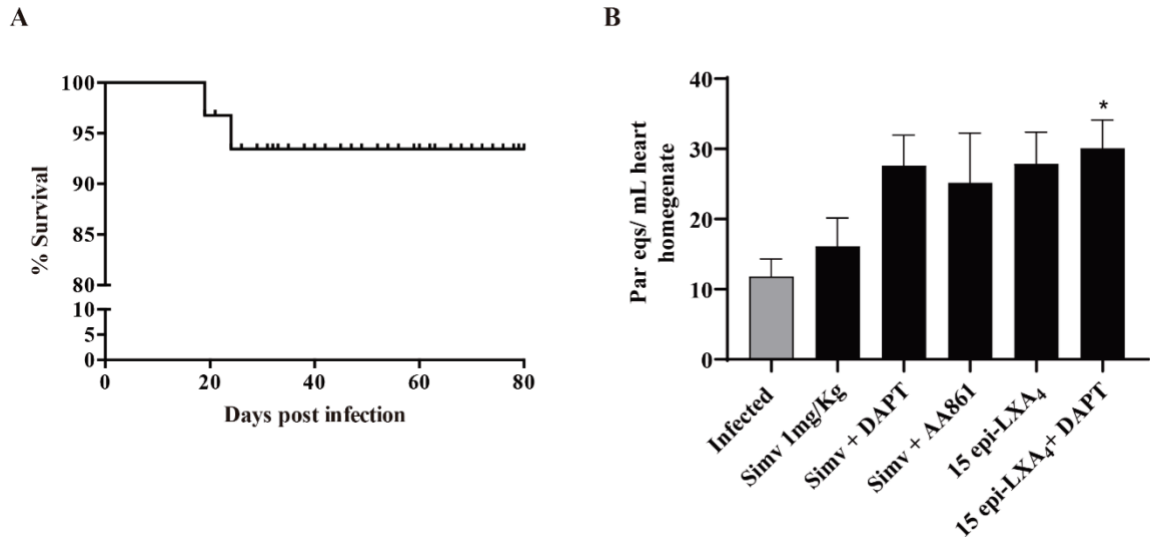


**Figura 13.** Simvastatina promueve la angiogenesis en ratones BALB/c cronicamente infectados con *T. cruzi*.

Los ratones BALB/c fueron infectados con  $1 \times 10^3$  tripomastigotes de *T. cruzi* y tratados durante 20 días a partir del día 60 postinfección. El tratamiento duró 20 días, al término de los cuales los animales fueron eutanasiados y los tejidos cardíacos fueron sometidos a análisis mediante microscopía confocal usando un Spinning Disk con lente 40X en aceite (NA=1,3). **A)** Panel representativo de tejido cardíaco analizado por inmunofluorescencia para Ki67 (verde), isolectina B4 (rojo) y DAPI. **B)** Panel representativo de tejido cardíaco analizado por inmunofluorescencia para NICD (verde), isolectina B4 (rojo) y DAPI. Las imágenes son representativas de cinco campos por corazón proveniente a su vez de cinco ratones.

En resumen, los resultados obtenidos en el modelo murino de infección crónica con *T. cruzi*, sugieren que el daño estructural del corazón y la función cardíaca alterada pueden mejorar con el tratamiento con simvastatina durante la fase crónica. Los resultados también sugieren que la acción de la simvastatina en este contexto puede estar mediada por las acciones antiinflamatorias de simvastatina, vía 15-epi-lipoxina A<sub>4</sub> y mediante la actividad de la vía de Notch 1.

Si bien en ratones BALB/c infectados con 1000 tripomastigotes de *T. cruzi* de la cepa Dm28c la mortalidad aguda puede llegar a ser de hasta un 50%, en nuestros experimentos, la supervivencia a los 30 días fue mayor al 95%, la que se mantuvo a lo largo de los 80 días que duró el experimento, independientemente de si recibieron algún tipo de tratamiento o no (**Figura 14A**). Por otro lado, la carga parasitaria en el corazón de los ratones no se vio afectada por los tratamientos administrados (**Figura 14B**). Lo anterior descarta que la infectividad de los parásitos empleados en el presente modelo esté disminuida o que los animales fueran resistentes a la infección crónica. Por otro lado, aunque no se observó la presencia del parásito en las histologías de los corazones de los animales eutanasiados, la presencia de una cardiomiopatía inflamatoria (**Figura 11A**), evidencia el efecto patogénico de la infección.



**Figura 14. Sobrevida y carga parasitaria de los ratones BALB/c infectados con *T. cruzi*.**

Los ratones BALB/c fueron infectados con  $1 \times 10^3$  tripomastigotes de *T. cruzi* Dm28c y tratados durante 20 días a partir del día 60 de infección. **A)** Análisis de la sobrevida analizada por curvas de Kaplan - Meier de un experimento con los distintos tratamientos. **B)** Carga parasitaria determinada por qPCR en tejido cardíaco de los animales al día 80 p.i. Los resultados están expresados como parásitos equivalentes por mL de homogenizado de corazón. Los datos corresponden a cinco corazones por grupo y están expresados como el promedio  $\pm$  SEM. Análisis por ANOVA de una vía con respecto al control infectado.

## DISCUSIÓN

La simvastatina, por sus efectos antiinflamatorios puede disminuir las alteraciones microvasculares inducidas por la persistencia del *T. cruzi* en tejido cardiaco, mejorando la función endotelial (Campos-Estrada, 2015). Este efecto esta mediado, al menos en parte, por 15-epi-LXA<sub>4</sub>. Por otro lado, Notch 1, que participa en la angiogénesis cardiaca, puede ser activado por simvastatina, como se ha visto en modelos de isquemia cerebral (Zacharek, 2009). Sin embargo, el efecto de simvastatina sobre la señalización de Notch 1 no se ha evaluado en células endoteliales o corazones infectados con *T. cruzi*.

En este estudio se demostró que simvastatina activa la vía de Notch 1 en un modelo de infección por *T. cruzi* en células endoteliales humanas, independiente de la síntesis de 15-epi-lipoxina A<sub>4</sub>. Como Notch 1 es una vía que se puede activar rápidamente frente a diversos estímulos y requerimientos celulares (Kikuchi et al. 2011), fue necesario determinar un tiempo y concentraciones óptimas de simvastatina para la medición del receptor y la actividad de la vía en este modelo. Se eligió la concentración máxima de 0,5  $\mu$ M de simvastatina, pues a concentraciones mayores tiene efecto tóxico, en concordancia con lo reportado previamente donde se encontró que produce disrupción del citoesqueleto y apoptosis celular, aunque el modelo celular fue diferente (Copaja et al. 2012).

Aunque la vía de Notch es particularmente relevante durante la vida embrionaria para el desarrollo cardiovascular, no se excluye que esté todavía presente en etapas más avanzadas de la vida. Así, efectivamente, en las células endoteliales de la vena umbilical los componentes de esta vía están presentes y son funcionales. Si bien las células HUVEC son de endotelio de vena umbilical, estas podrían ser consideradas adultas, por cuanto son del período fetal a término.

La infección con *T. cruzi* provoca un aumento en la actividad de la vía. La infección con *T. cruzi* provoca un aumento en la actividad de la vía. Nagajyothi y colaboradores encontraron que la infección de adipocitos con *T. cruzi* produce un

aumento en la actividad de la vía de Notch 1 (Nagajyothi et al. 2008). Nuestros resultados confirman esta observación, pero en un modelo celular diferente. No es extraño que una infección intracelular como la que produce el *T. cruzi* active esta vía, pues se ha demostrado un *cross-talk* entre la vía de señalización de Toll 2 (Castillo, 2017) con la vía de Notch a través de NF- $\kappa$ B (Hu, 2008; Osipo, 2008). Los resultados presentados en los ensayos *in vitro* sugieren fuertemente que la simvastatina es capaz de activar la vía de Notch 1, aún por encima de la inducida por la infección propiamente dicha.

La vía de Notch puede distinguir entre sus ligandos, lo cual genera un dinamismo que produce distintas respuestas transcripcionales y destinos celulares. Nandagopal y colaboradores verificaron, en un modelo de miogénesis, que dependiendo del ligando Dll1 o Dll4 en un modelo celular, NICD puede tener una dinámica pulsátil o sostenida, que lleva a aumentar Hes 1 o Hey 1 generando distintas respuestas (Nandagopal et al. 2018). Esto podría explicar por qué en nuestro modelo aumentan los niveles de Hes 1, no así los de Hey 1, incluso cuando la vía es activada por el ligando Jagged 1; reafirmando que, si se produce una activación, esta diferencial.

Aunque la fracción de células infectadas que exponen Notch es muy baja (inferior al 2%), la tendencia aumenta al añadir simvastatina o 15-epi-LXA4. Es probable que esto se deba a un aumento en el reciclaje del receptor. Parte de la complejidad de la vía de Notch 1 es el intenso tráfico y control endocítico al cual está sometido el receptor (Sala et al. 2012). En este punto es interesante señalar que es posible la activación de la vía independiente de ligando (Steinbuck and Winandy 2018); y que, entre los distintos mecanismos propuestos, la ubicación endosómica del receptor (Palmer and Deng 2015) surge como posibilidad y que podría, eventualmente, explicar parte de los resultados presentados acá. La degradación lisosómica de la porción extracelular del receptor puede activar la liberación por Ps 1 para generar el fragmento NICD (Conner 2016). En todo caso, la regulación endocítica de la vía de Notch es compleja y aún no está del todo clara en mamíferos. Por otro lado,

también podría asumirse que la detección del receptor está empañada por la presencia, en la misma membrana, de Jagged 1 preformado. Cuando Jagged 1 está en la misma membrana con Notch 1, tienden a unirse en *cis*, impidiendo su transactivación (Nandagopal et al. 2018). Bajo estas condiciones, los anticuerpos contra Notch 1 no lo reconocen, por cuanto el epítipo estaría oculto por Jagged 1. Sin embargo, en nuestros experimentos, la adición del péptido Jagged 1 a las células infectadas con *T. cruzi* aumentó la población de células que exponen Notch 1, si modificar la cantidad total de receptor, por lo que es más probable que también esté induciendo un proceso de reciclaje; sin embargo, esto está por ser demostrado aún. En todo caso, independientemente de la cantidad de receptor expuesto en la membrana, la vía de Notch es capaz de activarse.

La función endotelial puede ser mejorada con simvastatina a través de 15-epi-LXA<sub>4</sub> en un proceso donde interviene también NF-κB (Campos-Estrada, et al 2015); sin embargo, es poco probable que esta intermediación involucre a la vía de Notch 1. Los reportes que asocian la actividad de 15-epi-LXA<sub>4</sub> con Notch 1 son escasos, sin embargo, hay un estudio que demostró la capacidad de disminuir la actividad de esta vía en microglía con lipoxina A<sub>4</sub> (Wu et al. 2019); por lo que es factible que en el contexto de la inflamación estos eicosanoides tengan algún papel. Además, no se han reportado estudios que relacionen 15-epi-LXA<sub>4</sub> con Notch 1 y *T. cruzi*. A diferencia de lo descrito para LXA<sub>4</sub>, nuestros resultados demuestran un ligero aumento de células infectadas que presentan Notch cuando son tratadas con 15-epi-LXA<sub>4</sub>; sin embargo, no hay cambios en la activación de la vía, indicando un mecanismo distinto de la simvastatina.

Por otra parte, se ha propuesto que el aumento de la activación de Notch 1 se debe al aumento de Ps 1 especialmente con pitavastatina y atorvastatina (Kikuchi et al. 2011; Chen et al. 2007). Este efecto podría ser un efecto de clase, más que atribuirse exclusivamente a uno o varios integrantes de este grupo farmacológico. Sin embargo, en nuestro estudio simvastatina no modificó los niveles de Ps 1, sólo

se observó un aumento de la actividad. La  $\gamma$ -secretasa no sólo interactúa con Notch 1, sino también con múltiples proteínas y su afinidad por ellas podría estar modulada por el estado de Rac 1. Rac 1 es una proteína que pertenece a la familia Rho, una proteína G pequeña, que participa en diversas rutas de señalización y tráfico intracelular. Una particularidad de estas Rho GTPasas es que su actividad puede ser modulada alostéricamente por modificaciones como por ejemplo farnesilaciones y geranilaciones (Van Aelst and D'Souza-Schorey 1997). Entre los múltiples efectos descritos para las estatinas, se encuentra la inhibición de proteínas G pequeñas al disminuir la síntesis de isoprenoides como farnesilpirofosfato y geranilgeranil pirofosfato (Liao and Laufs 2005; Goldstein and Brown 1990). Se ha descrito que la inhibición de Rac 1 disminuye la afinidad de  $\gamma$ -secretasa por precursores amiloides y aumenta por Notch (Meng et al. 2015; Boo et al. 2008), lo que también podría explicar el aumento de NICD y activación del receptor. Alternativamente, el aumento de Ps 1 inducido por simvastatina podría estar mediado por la activación de PI3K/Akt, la cual se ha demostrado que es activada por simvastatina en células endoteliales (Kureishi, 2000). Así, el efecto de simvastatina sobre la vía de Notch 1 puede ser directamente sobre Ps 1 o indirectamente, mediante *cross-talk* con la vía de PI3K/Akt. Es decir, nuestros resultados sugieren que simvastatina activa, por medios no canónicos, la vía de Notch 1.

La activación no canónica de la vía de Notch 1 mediada por simvastatina a través de PI3K puede explicar, al menos en parte, los fenómenos pro-angiogénicos presentados en esta tesis, tanto en los experimentos *in vitro* como *in vivo*. De hecho, la simvastatina promueve la angiogénesis al activar PI3K/Akt (Kureishi et al. 2000). Este parece ser un efecto de clase, pues hay reportes con otras estatinas que también, a bajas concentraciones, son capaces de inducir angiogénesis (Urbich et al. 2002).

En ratones BALB/c los componentes de la vía Notch están presentes en tejido cardíaco sano. Contrario a lo observado en el modelo de células HUVEC, en los

ratones infectados con *T. cruzi*, la expresión de Notch 1 aumentó, lo que está de acuerdo con lo observado en modelos animales de isquemia cerebral (Zacharek, 2009). Pero, por otro lado, la actividad de la vía de Notch 1, aumentó en los corazones infectados y tratados con simvastatina, tal y como se observó en las células HUVEC.

En el modelo murino de infección empleado en este trabajo, se utilizaron dosis menores de simvastatina que las reportadas previamente (Gonzalez-Herrera et al. 2017), pero capaces de activar Notch 1 (Zacharek et al. 2009), debido a que a altas dosis se puede inhibir la angiogénesis (Kureishi, 2000) y además, producir reacciones adversas en los animales.

Como era esperado, la infección por *T. cruzi* produjo una inflamación cardíaca crónica, demostrada por un aumento significativo en la infiltración celular, fibrosis y producción de las citoquinas proinflamatorias TNF $\alpha$  e IL-1 $\beta$ , conllevando a la alteración de la función cardíaca, evidenciada por la disminución en la fracción de eyección y los cambios estructurales significativos, como la hipertrofia (aumento de la masa de del VI) y dilatación (aumento del diámetro del VI). Pero, además, como ya se mencionó antes, la activación endotelial, la inflamación miocárdica y la fibrosis pueden ser disminuidas con simvastatina, a través de la inducción en la producción de 15-epi-LXA4. Sin embargo, en el presente trabajo se reporta que la simvastatina también es capaz de mejorar la función miocárdica, de la misma manera que lo reportado en perros previamente (Melo et al. 2011); pero, relacionando la mejoría de la función cardíaca con la actividad de la vía de Notch, y la consecuente angiogénesis, miocárdica como componentes mecánicos de esta mejoría. En este caso, la participación de la 15-epi-LXA4 no fue tan clara pues no se pudo demostrar su intervención en la actividad de la vía de Notch ni en la angiogénesis. En todo caso, no se descarta que la acción de simvastatina sobre otros aspectos de la cardiomiopatía chagásica esté mediada por la 15epi-LXA4.



Estudios funcionales en diferentes especies o linajes celulares han demostrado que la señalización de Notch participa en el crecimiento angiogénico, la proliferación de células endoteliales y la diferenciación de arterias y venas (Roca and Adams 2007). La isolectina B<sub>4</sub> (IB<sub>4</sub>) se considera un marcador de células endoteliales, el cual junto con Ki67, disminuyó en los tejidos infectados, de acuerdo con lo reportando en otros estudios que demuestran que *T. cruzi* disminuye la angiogénesis (Teixeira et al. 2017). Además, los resultados presentados sugieren que el aumento de las células endoteliales con la administración de simvastatina pudiera estar mediado por la activación de Notch, y que esto podría ser parte de un efecto angiogénico que participa en la mejora de la función cardíaca observada en este modelo de cardiomiopatía chagásica crónica. Aunque todavía es controversial, algunos reportes han abordado la idea de que Notch puede tener un papel cardioprotector funcional durante la lesión por hipoxia/reperfusión (Zhou et al. 2018; Zhou et al. 2013). Además, se ha sugerido que la activación de la señalización de Notch en distintos modelos podría promover la angiogénesis, la función cardíaca y la supervivencia miocárdica, después de una lesión isquémica (Zhou et al. 2013; Zhou et al. 2018). De hecho, la hipoxia puede activar distintas vías que aumentan la actividad de Notch, incluido HIF-2 $\alpha$  (Walton et al. 2013). Al igual que con los receptores tipo Toll (TLR), la relación Notch-HIF es recíproca. Bajo isquemia cardíaca, HIF puede activar la translocación nuclear de NICD (Greer et al. 2012), promoviendo la angiogénesis para preservar la función cardíaca, previniendo la pérdida de cardiomiocitos y la fibrosis (Boopathy et al. 2015; Li, Hiroi, and Liao 2010).

Los resultados presentados en este trabajo son importantes por cuanto reportamos por primera vez una mejora funcional con un tratamiento no convencional de una cardiomiopatía inflamatoria de origen infeccioso. Aun manteniendo la carga parasitaria, que fue constante a lo largo de todo el experimento, el tratamiento con simvastatina logró proporcionar mejoría funcional correlacionada con la mejoría histológica, al disminuir la fibrosis. Por lo tanto, se puede especular que la

combinación de benznidazol con simvastatina podría mejorar aún más la condición cardíaca de los sujetos infectados, al eliminar el principal factor inductor de la cardiopatía con el antiparasitario, tema que podría ser objeto de estudio ulterior.

## CONCLUSIÓN

Los resultados indican que *T. cruzi* activa el receptor Notch 1 en células HUVEC. Simvastatina activa la vía en mayor proporción, con la consecuente formación de estructuras tubulares, lo cual es dependiente de la actividad de  $\gamma$ -secretasa e independiente de la producción de 15-epi-LXA<sub>4</sub>.

En el modelo murino de CCC, simvastatina mejora la función cardíaca, disminuye la inflamación y la remodelación cardíaca, además de promover la angiogénesis, a través de la activación de Notch 1 e independiente de la carga parasitaria.

Por lo tanto, simvastatina al activar la vía Notch 1 mejora las condiciones cardíacas al aumentar la perfusión, a pesar del daño inducido por *T. cruzi*.

Finalmente, como proyección de los resultados presentados en esta tesis, se propone estudiar el reposicionamiento de simvastatina, y en general, de las estatinas, para el manejo integral de personas con enfermedad de Chagas en fase crónica, como una nueva indicación clínica de este grupo de fármacos.

## REFERENCIAS

- Acevedo, G. R., M. C. Girard, and K. A. Gomez. 2018. 'The Unsolved Jigsaw Puzzle of the Immune Response in Chagas Disease', *Front Immunol*, 9: 1929.
- Albajar-Viñas, P., and J. C. Dias. 2014. 'Advancing the treatment for Chagas' disease', *N Engl J Med*, 370: 1942-3.
- Andrade, D. V., K. J. Gollob, and W. O. Dutra. 2014. 'Acute chagas disease: new global challenges for an old neglected disease', *PLoS Negl Trop Dis*, 8: e3010.
- Andrade, L., C. Machado, E. Chiari, S. Pena, and A. Macedo. 1999. 'Differential tissue distribution of diverse clones of Trypanosoma', *Mol Biochem Parasitol* 100: 163-72.
- Basil, M. C., and B. D. Levy. 2016. 'Specialized pro-resolving mediators: endogenous regulators of infection and inflammation', *Nat Rev Immunol*, 16: 51-67.
- Bern, C. 2015. 'Chagas' Disease', *N Engl J Med*, 373: 456-66.
- Bestetti, R. B., and A. Cardinalli-Neto. 2008. 'Sudden cardiac death in Chagas' heart disease in the contemporary era', *Int J Cardiol*, 131: 9-17.
- Bestetti, R. B., and T. A. Theodoropoulos. 2009. 'A systematic review of studies on heart transplantation for patients with end-stage Chagas' heart disease', *J Card Fail*, 15: 249-55.
- Boo, J. H., J. H. Sohn, J. E. Kim, H. Song, and I. Mook-Jung. 2008. 'Rac1 changes the substrate specificity of gamma-secretase between amyloid precursor protein and Notch1', *Biochem Biophys Res Commun*, 372: 913-7.
- Booney, K. M., D. J. Luthringer, S. A. Kim, N. J. Garg, and D. M. Engman. 2019. 'Pathology and Pathogenesis of Chagas Disease Heart', *Annu. Rev. Pathol. Mech. Dis.*, 14: 421-47.
- Boopathy, A. V., M. D. Martinez, A. W. Smith, M. E. Brown, A. J. Garcia, and M. E. Davis. 2015. 'Intramyocardial Delivery of Notch Ligand-Containing Hydrogels Improves Cardiac Function and Angiogenesis Following Infarction', *Tissue Eng Part A*, 21: 2315-22.
- Botoni, F. A., P. A. Poole-Wilson, A. L. Ribeiro, D. O. Okonko, B. M. Oliveira, A. S. Pinto, M. M. Teixeira, A. L. Teixeira, Jr., A. M. Reis, J. B. Dantas, C. S. Ferreira, W. C. Tavares, Jr., and M. O. Rocha. 2007. 'A randomized trial of carvedilol after renin-angiotensin system inhibition in chronic Chagas cardiomyopathy', *Am Heart J*, 153: 544 e1-8.
- Campos-Estrada, C., A. Liempi, F. González-Herrera, M. Lapier, U. Kemmerling, and B. Pesce. 2015. 'Simvastatin and Benznidazole-Mediated Prevention of Trypanosoma cruzi-Induced Endothelial Activation: Role of 15-epi-lipoxin A4 in the Action of Simvastatin', *PLoS Negl Trop Dis*, 9: 1-19.
- Chengode, S. 2016. 'Left ventricular global systolic function assessment by echocardiography', *Ann Card Anaesth*, 19: S26-S34.

- Chiang, N., M. Arita, and C. N. Serhan. 2005. 'Anti-inflammatory circuitry: lipoxin, aspirin-triggered lipoxins and their receptor ALX', *Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids*, 73: 163-77.
- Conner, S. D. 2016. 'Regulation of Notch Signaling Through Intracellular Transport', *Int Rev Cell Mol Biol*, 323: 107-27.
- Copaja, M., D. Venegas, P. Aranguiz, J. Canales, R. Vivar, Y. Avalos, L. Garcia, M. Chiong, I. Olmedo, M. Catalan, L. Leyton, S. Lavandero, and G. Diaz-Araya. 2012. 'Simvastatin disrupts cytoskeleton and decreases cardiac fibroblast adhesion, migration and viability', *Toxicology*, 294: 42-9.
- Duffy, T., C. I. Cura, J. C. Ramirez, T. Abate, N. M. Cayo, R. Parrado, Z. D. Bello, E. Velazquez, A. Munoz-Calderon, N. A. Juiz, J. Basile, L. Garcia, A. Riarte, J. R. Nasser, S. B. Ocampo, Z. E. Yadon, F. Torrico, B. A. de Noya, I. Ribeiro, and A. G. Schijman. 2013. 'Analytical performance of a multiplex Real-Time PCR assay using TaqMan probes for quantification of *Trypanosoma cruzi* satellite DNA in blood samples', *PLoS Negl Trop Dis*, 7: e2000.
- Fan, Y., H. Dong, Q. Pan, Y. Cao, H. Li, and H. Wang. 2011. 'Notch signaling may negatively regulate neonatal rat cardiac fibroblast-myofibroblast transformation', *Physiol. Res*, 60: 739-48.
- Flavia Nardy, A., C. G. Freire-de-Lima, and A. Morrot. 2015. 'Immune Evasion Strategies of *Trypanosoma cruzi*', *J Immunol Res*, 2015: 178947.
- Goldstein, J. L., and M. S. Brown. 1990. 'Regulation of the mevalonate pathway', *Nature*, 343: 425-30.
- Gonzalez-Herrera, F., A. Cramer, P. Pimentel, C. Castillo, A. Liempi, U. Kemmerling, F. S. Machado, and J. D. Maya. 2017. 'Simvastatin Attenuates Endothelial Activation through 15-Epi-Lipoxin A4 Production in Murine Chronic Chagas Cardiomyopathy', *Antimicrob Agents Chemother*, 61.
- Gray, E. B., R. M. La Hoz, J. S. Green, H. R. Vikram, T. Benedict, H. Rivera, and S. P. Montgomery. 2018. 'Reactivation of Chagas disease among heart transplant recipients in the United States, 2012-2016', *Transpl Infect Dis*, 20: e12996.
- Greer, S. N., J. L. Metcalf, Y. Wang, and M. Ohh. 2012. 'The updated biology of hypoxia-inducible factor', *EMBO J*, 31: 2448-60.
- Gutierrez, F. R., P. M. Guedes, R. T. Gazzinelli, and J. S. Silva. 2009. 'The role of parasite persistence in pathogenesis of Chagas heart disease', *Parasite Immunol*, 31: 673-85.
- Healy, C., J. F. Viles-Gonzalez, L. C. Saenz, M. Soto, J. D. Ramirez, and A. d'Avila. 2015. 'Arrhythmias in chagasic cardiomyopathy', *Card Electrophysiol Clin*, 7: 251-68.
- High, F. A., and J. A. Epstein. 2008. 'The multifaceted role of Notch in cardiac development and disease', *Nat Rev Genet*, 9: 49-61.
- Kikuchi, R., K. Takeshita, Y. Uchida, M. Kondo, X. W. Cheng, T. Nakayama, K. Yamamoto, T. Matsushita, J. K. Liao, and T. Murohara. 2011. 'Pitavastatin-induced angiogenesis and arteriogenesis is mediated by Notch1 in a murine hindlimb ischemia model without induction of VEGF', *Lab Invest*, 91: 691-703.

- Kopan, R., and M. X. Ilagan. 2009. 'The canonical Notch signaling pathway: unfolding the activation mechanism', *Cell*, 137: 216-33.
- Kureishi, Y., Z. Luo, I. Shiojima, A. Bialik, D. Fulton, D. J. Lefer, W. C. Sessa, and K. Walsh. 2000. 'The HMG-CoA reductase inhibitor simvastatin activates the protein kinase Akt and promotes angiogenesis in normocholesterolemic animals', *Nat Med*, 6: 1004-10.
- Levy, B. D. 2006. 'Myocardial 15-epi-lipoxin A4 generation provides a new mechanism for the immunomodulatory effects of statins and thiazolidinediones', *Circulation*, 114: 873-5.
- Li, Y., Y. Hiroi, and J. K. Liao. 2010. 'Notch signaling as an important mediator of cardiac repair and regeneration after myocardial infarction', *Trends Cardiovasc Med*, 20: 228-31.
- Liao, J. K., and U. Laufs. 2005. 'Pleiotropic effects of statins', *Annu Rev Pharmacol Toxicol*, 45: 89-118.
- Marin-Neto, J. A., E. Cunha-Neto, B. C. Maciel, and M. V. Simoes. 2007. 'Pathogenesis of chronic Chagas heart disease', *Circulation*, 115: 1109-23.
- Melo, L., I. S. Caldas, M. A. Azevedo, K. R. Goncalves, A. F. da Silva do Nascimento, V. P. Figueiredo, L. de Figueiredo Diniz, W. G. de Lima, R. M. Torres, M. T. Bahia, and A. Talvani. 2011. 'Low doses of simvastatin therapy ameliorate cardiac inflammatory remodeling in Trypanosoma cruzi-infected dogs', *Am J Trop Med Hyg*, 84: 325-31.
- Meng, S., Z. Su, Z. Liu, N. Wang, and Z. Wang. 2015. 'Rac1 contributes to cerebral ischemia reperfusion-induced injury in mice by regulation of Notch2', *Neuroscience*, 306: 100-14.
- Molina-Berrios, A., C. Campos-Estrada, M. Lapier, J. Duaso, U. Kemmerling, N. Galanti, J. Ferreira, A. Morello, R. Lopez-Munoz, and J. D. Maya. 2013. 'Protection of vascular endothelium by aspirin in a murine model of chronic Chagas' disease', *Parasitol Res*, 112: 2731-9.
- Morillo, C. A., J. A. Marin-Neto, A. Avezum, S. Sosa-Estani, A. Rassi, Jr., F. Rosas, E. Villena, R. Quiroz, R. Bonilla, C. Britto, F. Guhl, E. Velazquez, L. Bonilla, B. Meeks, P. Rao-Melacini, J. Pogue, A. Mattos, J. Lazdins, A. Rassi, S. J. Connolly, S. Yusuf, and Benefit Investigators. 2015. 'Randomized Trial of Benznidazole for Chronic Chagas' Cardiomyopathy', *N Engl J Med*, 373: 1295-306.
- Nagajyothi, Fnu, Mahalia S. Desruisseaux, Niranjana Thiruvur, Louis M. Weiss, Vicki L. Braunstein, Chris Albanese, Mauro M. Teixeira, Cecilia J. De Almeida, Michael P. Lisanti, Philipp E. Scherer, and Herbert B. Tanowitz. 2008. 'Trypanosoma cruzi Infection of Cultured Adipocytes Results in an Inflammatory Phenotype', *Obesity*, 16: 1992-97.
- Nandagopal, N., L. A. Santat, L. LeBon, D. Sprinzak, M. E. Bronner, and M. B. Elowitz. 2018. 'Dynamic Ligand Discrimination in the Notch Signaling Pathway', *Cell*, 172: 869-80 e19.
- National\_Research\_Council. 2011. *Guide for the care and use of laboratory animals* (The National Academies Press.: Washington D.C. U.S.A.).

- Nunes, M. C., M. M. Barbosa, A. L. Ribeiro, E. A. Colosimo, and M. O. Rocha. 2009. 'Left atrial volume provides independent prognostic value in patients with Chagas cardiomyopathy', *J Am Soc Echocardiogr*, 22: 82-8.
- Nunes, M. C., W. Dones, C. A. Morillo, J. J. Encina, A. L. Ribeiro, and Cardiology Council on Chagas Disease of the Interamerican Society of. 2013. 'Chagas disease: an overview of clinical and epidemiological aspects', *J Am Coll Cardiol*, 62: 767-76.
- Palmer, W. H., and W. M. Deng. 2015. 'Ligand-Independent Mechanisms of Notch Activity', *Trends Cell Biol*, 25: 697-707.
- Petri, M. H., A. Laguna-Fernandez, C. N. Tseng, U. Hedin, M. Perretti, and M. Back. 2015. 'Aspirin-triggered 15-epi-lipoxin A(4) signals through FPR2/ALX in vascular smooth muscle cells and protects against intimal hyperplasia after carotid ligation', *Int J Cardiol*, 179: 370-2.
- Prata, Aluizio. 2001. 'Clinical and epidemiological aspects of Chagas disease', *The Lancet Infectious Diseases*, 1: 92-100.
- Rassi, A Jr; Rassi, A; Marin-Neto 2010. 'Chagas disease', *Lancet*, 375: 1388-402.
- Ribeiro, A. L., M. P. Nunes, M. M. Teixeira, and M. O. Rocha. 2012. 'Diagnosis and management of Chagas disease and cardiomyopathy', *Nat Rev Cardiol*, 9: 576-89.
- Ribeiro, I., A. M. Sevcsik, F. Alves, G. Diap, R. Don, M. O. Harhay, S. Chang, and B. Pecoul. 2009. 'New, improved treatments for Chagas disease: from the R&D pipeline to the patients', *PLoS Negl Trop Dis*, 3: e484.
- Roca, C., and R. H. Adams. 2007. 'Regulation of vascular morphogenesis by Notch signaling', *Genes Dev*, 21: 2511-24.
- Sala, E., L. Ruggiero, G.D. Giacomo, and Cremona O. 2012. 'Endocytosis in Notch signaling activation.' in B. Ceresa (ed.), *Molecular regulation of endocytosis* (INTECHOpen: London, U.K.).
- Serhan, C. N. 2002. 'Lipoxins and aspirin-triggered 15-epi-lipoxin biosynthesis: an update and role in anti-inflammation and pro-resolution', *Prostaglandins Other Lipid Mediat*, 68-69: 433-55.
- Serhan, C. N., N. Chiang, J. Dalli, and B. D. Levy. 2014. 'Lipid mediators in the resolution of inflammation', *Cold Spring Harb Perspect Biol*, 7: a016311.
- Stein, C., C. B. Migliavaca, V. Colpani, P. R. da Rosa, D. Sganzerla, N. E. Giordani, Srps Miguel, L. N. Cruz, C. A. Polanczyk, A. L. P. Ribeiro, and M. Falavigna. 2018. 'Amiodarone for arrhythmia in patients with Chagas disease: A systematic review and individual patient data meta-analysis', *PLoS Negl Trop Dis*, 12: e0006742.
- Steinbuck, M. P., and S. Winandy. 2018. 'A Review of Notch Processing With New Insights Into Ligand-Independent Notch Signaling in T-Cells', *Front Immunol*, 9: 1230.
- Teixeira, S. C., D. S. Lopes, S. N. Gimenes, T. L. Teixeira, M. S. da Silva, R. T. Brigido, F. A. da Luz, A. A. da Silva, M. A. Silva, P. V. Florentino, P. C. Tavares, M. A. Dos Santos, V. M. Avila, M. J. Silva, M. C. Elias, R. A. Mortara, and C. V. da Silva. 2017. 'Mechanistic Insights into the Anti-angiogenic Activity

- of Trypanosoma cruzi Protein 21 and its Potential Impact on the Onset of Chagasic Cardiomyopathy', *Sci Rep*, 7: 44978.
- Urbich, C., E. Dernbach, A. M. Zeiher, and S. Dimmeler. 2002. 'Double-edged role of statins in angiogenesis signaling', *Circ Res*, 90: 737-44.
- Van Aelst, L., and C. D'Souza-Schorey. 1997. 'Rho GTPases and signaling networks', *Genes Dev*, 11: 2295-322.
- van Tetering, G., and M. Vooijs. 2011. 'Proteolytic cleavage of Notch: "HIT and RUN"', *Curr Mol Med*, 11: 255-69.
- Viotti, R. J. 2004. 'Value of echocardiography for diagnosis and prognosis of chronic Chagas disease cardiomyopathy without heart failure', *Heart*, 90: 655-60.
- Walton, C. B., J. Ecker, C. D. Anderson, J. T. Outten, R. Z. Allison, and R. V. Shoheit. 2013. 'Cardiac angiogenesis directed by stable Hypoxia Inducible Factor-1', *Vasc Cell*, 5: 15.
- Wu, J., D. H. Ding, Q. Q. Li, X. Y. Wang, Y. Y. Sun, and L. J. Li. 2019. 'Lipoxin A4 Regulates Lipopolysaccharide-Induced BV2 Microglial Activation and Differentiation via the Notch Signaling Pathway', *Front Cell Neurosci*, 13: 19.
- Xu, J., X. Liu, J. Chen, A. Zacharek, X. Cui, S. Savant-Bhonsale, Z. Liu, and M. Chopp. 2009. 'Simvastatin enhances bone marrow stromal cell differentiation into endothelial cells via notch signaling pathway', *Am J Physiol Cell Physiol*, 296: C535-43.
- Zacharek, A., J. Chen, X. Cui, Y. Yang, and M. Chopp. 2009. 'Simvastatin increases notch signaling activity and promotes arteriogenesis after stroke', *Stroke*, 40: 254-60.
- Zhou, X. L., and J. C. Liu. 2014. 'Role of Notch signaling in the mammalian heart', *Braz J Med Biol Res*, 47: 1-10.
- Zhou, X. L., L. Wan, Q. R. Xu, Y. Zhao, and J. C. Liu. 2013. 'Notch signaling activation contributes to cardioprotection provided by ischemic preconditioning and postconditioning', *J Transl Med*, 11: 251.
- Zhou, X. L., R. R. Zhu, S. Liu, H. Xu, X. Xu, Q. C. Wu, and J. C. Liu. 2018. 'Notch signaling promotes angiogenesis and improves cardiac function after myocardial infarction', *J Cell Biochem*, 119: 7105-12.



## Publicaciones derivadas de esta tesis

### Artículos

Guzmán-Rivera, D.; Liempi, A.; González-Herrera, F.; Fuentes, S.; Carrillo, I; Abarca, P.; Castillo, C., Kemmerling, K.; Pesce, B.; Juan Diego Maya, J.D. Simvastatin improves cardiac function through Notch 1 activation in BALB/c mice with Chronic 1 Chagas Cardiomyopathy. 2020. Antimicrobial agents and chemotherapy. **In press**.

### Presentaciones a congreso

1. **Guzmán-Rivera, Daniela;** González, F; Carrillo, I; Liempi, A; Fuentes-Retamal S; Pesce, B; Castillo, C; Kemmerling, U; Maya, JD. Simvastatin and 15-epi-lipoxin A4 induce cardiac repairment through Notch 1 activation in Chronic Chagas Cardiomyopathy. XLI Congreso Anual de la Sociedad de Microbiología de Chile. 5 al 8 de noviembre, 2019, Puerto Varas. Presentación de póster. Segundo lugar de póster
2. **Maya, Juan Diego;** Guzmán-Rivera, D; González, F; Carrillo, I; Lapier, M; Quintero, H; Liempi, A; Fuentes-Retamal S; Pesce, B; Castillo, C; Kemmerling, U; Simvastatin and 15-epi-lipoxin A4 induce cardiac repairment through Notch 1 activation in Chronic Chagas Cardiomyopathy. XLI Congreso Anual de la Sociedad de Farmacología de Chile. 4 al 8 de noviembre, 2019, Concepción. Presentación de póster.
3. **Guzmán-Rivera, Daniela;** González, F; Carrillo, I; Liempi, A; Fuentes-Retamal S; Pesce, B; Castillo, C; Kemmerling, U; Maya, JD. Simvastatin induces Notch 1 activation in *Trypanosoma cruzi* endothelial infection. Bristol ENDOTHELIAL meeting. 19 de septiembre, 2019, Bristol, Inglaterra. Presentación poster
4. **Guzmán-Rivera, Daniela;** González, Fabiola; Lapier, Michel; Carrillo, Ileana; Pesce, Bárbara; Castillo, Christian; Liempi, Ana; Fuentes-Retamal, Sebastián; Kemmerling, Ulrike; Maya, Juan Diego. Simvastatin and 15-epi-lipoxin A4 induce cardiac repair through Notch 1 activation in Chronic Chagas Cardiomyopathy. 18<sup>th</sup> World Congress of Basic and Clinical Pharmacology 2018. 01 al 06 Julio de 2018, Kioto, Japón. Presentación oral.
5. **Guzmán, Daniela;** González, Fabiola; Lapier, Michel; Fuentes, Sebastián; Pesce, Bárbara; Carrillo, Ileana; Castillo, Christian; Liempi, Ana; Kemmerling, Ulrike; Maya, Juan Diego. Simvastatina induce la activación de Notch 1 en la infección endotelial por *Trypanosoma cruzi*. XXIV Congreso Latinoamericano de Parasitología FLAP 2017. 10 al 14 de diciembre de 2017. Santiago de Chile.

6. **Guzmán-Rivera, D;** González-Herrera, F; Lapier, M; Pesce, B; Rodríguez, E; Castillo, C; Liempi A; Kemmerling, U; Maya, JD. Simvastatina induce la activación de Notch 1 en la infección endotelial por *Trypanosoma cruzi*. XXXIX Congreso Anual de la Sociedad de Farmacología de Chile. Puerto Varas. 22 al 25 de noviembre 2017.
7. **Guzmán-Rivera, D;** González-Herrera, F; Pesce, B; Castillo, C; Liempi, A; Carrillo, I; Kemmerling, U; Machado, FS; Maya, JD. VI Simvastatina induce la reparación cardiaca a través de la activación de Notch 1 en la Cardiomiopatía Chagásica Crónica. VI Reunión Nacional Integrada Prevención y Control de la Enfermedad de Chagas, VII Simposio Internacional Sobre Enfermedad de Chagas. Santiago. 14 y 15 de noviembre 2016. Presentación de póster.
8. **Guzmán-Rivera D,** González-Herrera F, Lapier M, Pesce B, Maya JD. Simvastatin Induces Cardiac Repairment Through Notch 1 Activation in Chronic Chagas Cardiomyopathy. 21st Latin American Congress of Pharmacology, Foz de Iguazu, Brasil, 4 a 7 de octubre 2016. Presentación de póster.