



Universidad de Chile
Facultad de medicina
Escuela de Tecnología Médica

“EFECTO DE SIMVASTATINA SOBRE CÉLULAS ENDOTELIALES INFECTADAS CON Trypanosoma cruzi”

TESIS PROFESIONAL PARA OPTAR AL TÍTULO DE TECNÓLOGO MÉDICO CON
MENCIÓN EN BIOANÁLISIS CLÍNICO, HEMATOLOGÍA Y BANCO DE SANGRE.

AUTOR: José Medina Vargas.

TUTOR: Juan Diego Maya.

2014

ÍNDICE

TÍTULO DEL PROYECTO.....	3
RESUMEN DEL PROYECTO.....	3
INTRODUCCIÓN.....	4-5
MARCO TEÓRICO.....	6-17
HIPÓTESIS.....	18
OBJETIVOS.....	18
MATERIALES Y MÉTODOS.....	19-23
RESULTADOS.....	24-39
REFERENCIAS.....	40-43

ANTECEDENTES Y PROPOSICIÓN GENERAL DEL PROYECTO DE TESIS PROFESIONAL.

1. TÍTULO DEL PROYECTO:

“Efecto de simvastatina sobre células endoteliales infectadas con *Trypanosoma cruzi*”

2.- RESUMEN DEL PROYECTO:

La fase crónica de la enfermedad de Chagas se desarrolla en el 30% de los individuos en la forma de cardiomiopatía.

La Cardiomiopatía Chagásica Crónica (CCC) se origina por una respuesta inflamatoria persistente, donde cursa con arritmias complejas, falla cardíaca, tromboembolismo, muerte súbita y daño microvascular.

El tratamiento antiparasitario actual de la enfermedad de Chagas se realiza con benznidazol o nifurtimox. Ambos fármacos son tripanocidas, pero pueden presentar efectos adversos y han demostrado eficacia limitada en la fase crónica de la enfermedad de Chagas. Así, se ha descrito que las estatinas, tradicionalmente fármacos hipolipemiantes, también tienen otros efectos llamados “pleiotrópicos” que pueden mejorar la eficacia de estos fármacos, modificando aspectos centrales de la fisiopatología de la CCC. Algunos autores proponen que este efecto de las estatinas está mediado por 15-epi-lipoxina A4 (15-epi-LXA4); un eicosanoide pro-resolutorio de la inflamación. Por lo tanto, es posible proponer que las estatinas podrían mejorar la eficacia del tratamiento disponible. De acuerdo a esto, se postula que la simvastatina disminuye la expresión de moléculas de adhesión en células endoteliales infectadas con *Trypanosoma cruzi*, a través de la inducción de la producción del eicosanoide antiinflamatorio 15-epi-LXA4; por lo tanto, se evaluará el efecto mediante citometría de

flujo y se relacionará con la producción de 15-epi-LXA4 a través de inmunoensayos. Se espera que al tratar las células con simvastatina disminuya la expresión en la superficie endotelial de moléculas de adhesión y aumente significativamente 15-epi-LXA4.

3. INTRODUCCIÓN:

Hay 10 millones de personas con enfermedad de Chagas en América Latina. Esta enfermedad es causada por el protozoo flagelado *Trypanosoma cruzi*¹. Este parásito infecta células nucleadas, incluyendo a las del sistema inmune, desencadenando una respuesta inflamatoria que es crucial para controlar la replicación del parásito. Cuando la respuesta inflamatoria se mantiene a través del tiempo, se desarrolla la fase crónica de la enfermedad, que puede afectar principalmente corazón, colón y esófago. La forma crónica determinada que afecta al corazón, se denomina Cardiopatía Chagásica Crónica (CCC), donde los pacientes con esta afección pueden presentar arritmias, falla cardíaca, tromboembolismo y muerte súbita. Los mecanismos fisiopatológicos aún no se han descrito completamente. Sin embargo, evidencia en animales y seres humanos sugieren 4 mecanismos involucrados: la disautonomía cardíaca, alteraciones microvasculares, daño miocárdico dependiente del parásito, y lesión miocárdica mediada por la respuesta inmune².

Varios estudios han evidenciado que durante el curso de la CCC, hay daño microvascular³. La infección por *T. cruzi* en células endoteliales provoca su activación, aumentando la expresión de moléculas de adhesión celular como la E-selectina, VCAM-1 (*vascular cell adhesión molecule-1*) e ICAM-1 (*intercellular cell adhesión molecule-1*), fomentando la llegada de células inflamatorias; además, se aumenta el tono vascular y

se favorece la agregación de plaquetas, provocando isquemia. Todos estos efectos se han asociado con la activación del factor nuclear kB (NF-kB)⁴.

Hoy en día el tratamiento se realiza con nifurtimox o benznidazol, que también provocan efectos adversos en los pacientes y han presentado eficacia limitada en la fase crónica de la enfermedad⁵. Sin embargo, se ha propuesto que la combinación con otros medicamentos podría aumentar el efecto tripanocida de los fármacos convencionales y mejorar aspectos fisiopatológicos involucrados en los trastornos crónicos. Es así como las estatinas, que tienen efectos antiinflamatorios⁶, antiagregantes plaquetarios⁷ y también disminuyen la expresión de moléculas de adhesión⁸, podrían ayudar durante el tratamiento, especialmente en la fase crónica de la enfermedad.

La 15-epi-LXA4, un eicosanoide muy eficaz contra la inflamación, podría ser el mediador de los efectos de las estatinas⁹. Por lo tanto, se propone que las estatinas particularmente la simvastatina, podría disminuir la activación endotelial en la CCC, a través de la producción de 15-epi-LXA4 y con ello un tratamiento para la disfunción endotelial y una eficacia al tratamiento ya disponible. Hay pocos antecedentes del beneficio de las estatinas en la CCC.

La necesidad de encontrar mejores fármacos para tratar la enfermedad de Chagas sigue siendo urgente, por tanto al responder esta hipótesis, se sustenta la idea de mejorar la eficiencia del tratamiento disponible en la actualidad, con fármacos ya en uso y por tanto clínicamente bien conocidos.

4. MARCO TEÓRICO:

Antecedentes

La enfermedad de Chagas es una infección sistémica causada por el protozoo flagelado llamado *Trypanosoma cruzi*. Fue descubierta por un médico brasileño Carlos Chagas en 1909. Es transmitida al ser humano y a más de 150 especies de mamíferos por medio de un insecto vector de la subfamilia de los hematófagos *Triatominae*. Una de las especies presente en Chile corresponde a *Triatoma infestans*, conocido vulgarmente como vinchuca¹⁰.

Epidemiología

Aproximadamente 10 millones de personas tienen esta enfermedad en América Latina, donde es endémica^{1,10}. Se calcula que más de 25 millones de personas están en riesgo de contraer la enfermedad de Chagas y en el año 2008 murieron más de 10.000 personas por esta causa¹. A pesar de que la incidencia de esta enfermedad ha disminuido en los últimos 20 años gracias a programas de control del vector biológico, sigue siendo un importante problema de salud pública¹.

Ciclo de vida del *Trypanosoma cruzi*

El parásito tiene un ciclo de vida complejo que consta de cuatro etapas. Comienza cuando los **tripomastigotes** (forma infectante del parásito) sanguíneos son ingeridos por los insectos triatominos y una vez en el intestino anterior, se transforman en **epimastigotes** (forma replicativa del parásito). Desde el intestino anterior, los parásitos se transforman en **tripomastigotes metacíclicos**, durante su paso al intestino posterior del insecto. Estos son depositados a través de las heces del insecto vector cuando se

alimenta en un hospedero mamífero. El parásito que se encuentra en las heces cargadas ingresa por la mucosa, conjuntivas o heridas de piel producto de la picadura del vector. Una vez estando el parásito en el hospedero mamífero, los tripomastigotes entran a una célula y se transforman en amastigotes (forma intracelular y replicativa del parásito). Los amastigotes luego se transforman en tripomastigotes que se liberan al torrente sanguíneo producto de la ruptura de la célula infectada¹¹.

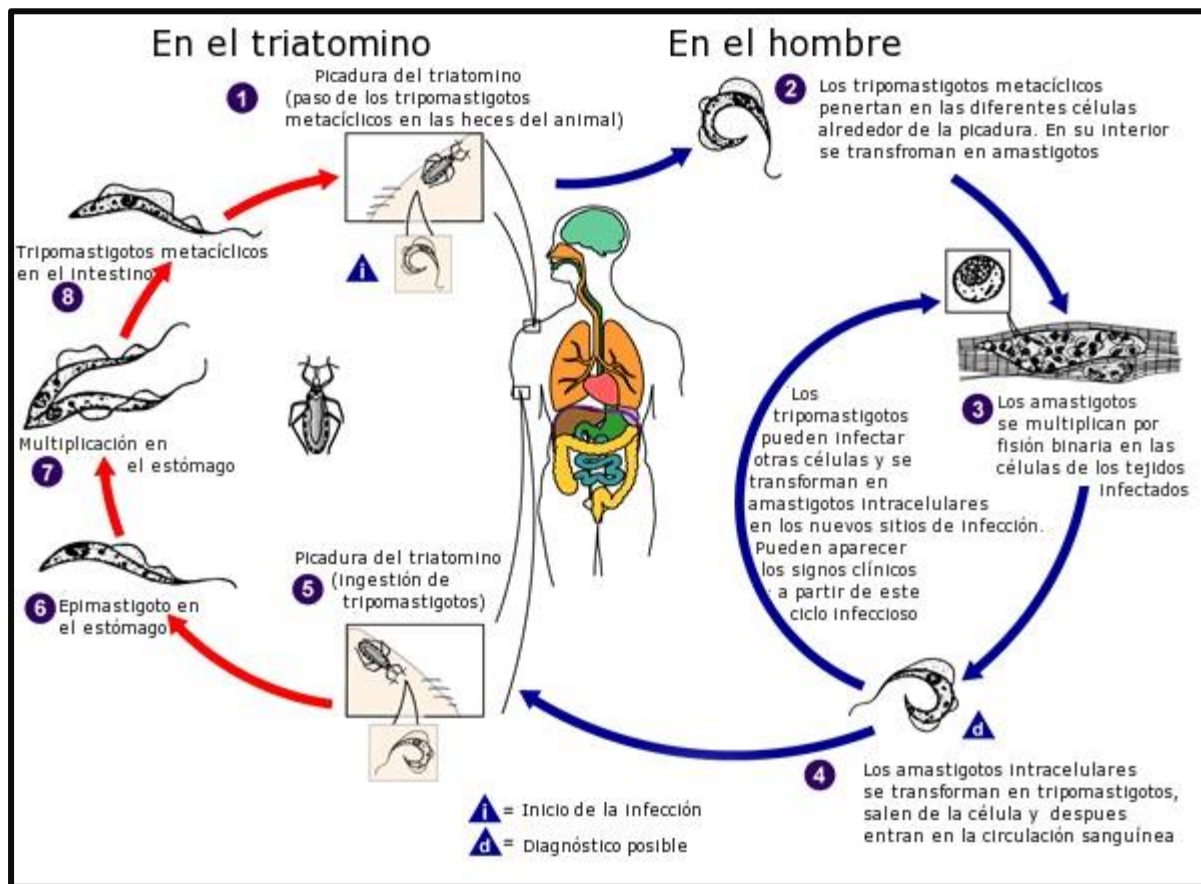


Figura 1. Ciclo de vida de *Trypanosoma cruzi* en el hospedero y en el insecto vector. Fuente: www.cdc.gov/parasites/chagas/biology.html

Presentación clínica de la enfermedad de Chagas

Clínicamente, la enfermedad de Chagas presenta dos fases: aguda y crónica. La fase aguda es a menudo asintomática o puede presentarse con una fiebre autolimitada, taquicardia, además de otros síntomas inespecíficos. También suele presentarse una lesión inflamatoria en el lugar por donde ingresa el parásito llamada chagoma, un edema periorbitario unilateral (Signo de Romaña), conjuntivitis, entre otros¹¹. El 90% de los pacientes que presentan estas manifestaciones de la fase aguda lo resuelven espontáneamente¹⁰.

La fase crónica se presenta en forma latente y, luego de 10 a 30 años de su infección inicial, un 30% aproximadamente de los pacientes comienzan a presentar manifestaciones clínicas de tipo cardíaca o digestiva y una proporción mucho menor de pacientes pueden presentar ambas¹².

Hay que tener presente que en una infección aguda hay un gran aumento de parásitos en sangre, que al entrar en contacto con las células del sistema inmune producen una respuesta inflamatoria, cuyo propósito es evitar la proliferación del parásito. Si esta respuesta inflamatoria es permanente en el tiempo, da lugar a la fase crónica de esta enfermedad, donde los parásitos se encuentran alojados en los órganos y tejidos del hospedero mamífero, entre ellos el corazón y disminuyen en sangre¹³.

Respuesta en el hospedero

Los efectos de la enfermedad, así como en otras infecciones, dependen tanto del parásito como del hospedero mamífero. Diferentes estudios en modelos experimentales

han descrito que IFN-gamma (IFN- γ) y macrófagos son elementos importantes que controlan la replicación del parásito durante la fase aguda de la infección¹⁴.

Cuando el parásito infecta células nucleadas, como por ejemplo los macrófagos, estas liberan interleuquina 12 (IL-12) que induce la liberación de IFN- γ desde las células *Natural Killer* (NK)¹⁵. Además, IFN- γ junto al factor de necrosis tumoral α (TNF- α), induce la expresión de la enzima óxido nítrico sintasa inducible (iNOS)¹⁶. La expresión de iNOS producida por citoquinas inflamatorias favorece la liberación de grandes cantidades de óxido nítrico (NO \cdot). El exceso de NO \cdot puede reaccionar con el anión superóxido y radicales libres (O $2^{\cdot-}$), produciendo especies altamente reactivas, como el peroxinitrito, que puede llegar a ser altamente tóxico para el parásito¹⁷.

Por lo tanto, el aumento inicial de la parasitemia es controlada por citoquinas proinflamatorias y mediadores microbicidas liberados por los macrófagos y las células NK. Estas respuestas inmunes innatas son seguidas por la activación policlonal de los principales subgrupos de linfocitos, y la aparición de la inmunidad adquirida contra el parásito mediado por células T CD4 $^+$, células T CD8 $^+$ y las células B^{13a,18}.

En conjunto, estas respuestas inmunitarias reducen, pero no eliminan la carga parasitaria. En cuanto a las células T, las respuestas Th1 CD4 $^+$ median en la protección contra la infección por *T. cruzi*, mientras que se ha descrito que las respuestas Th2 se correlacionan con la persistencia del parásito^{18,19}.

Las respuestas proinflamatorias activadas por el *T. cruzi* son contrarrestadas por respuestas antiinflamatorias mediadas principalmente por IL-10 y factor de crecimiento transformante- β (TGF- β)²⁰. Las respuestas antiinflamatorias inducidas por *T. cruzi*

juegan un papel importante en la persistencia del parásito y es el mecanismo que tiene el parásito para evadir al sistema inmune¹⁹.

Por otra parte, la infección con *T. cruzi* desencadena la apoptosis de los linfocitos T y linfocitos B²¹. Luego de la apoptosis, las células muertas son fagocitadas por los macrófagos. La fagocitosis de los linfocitos apoptóticos permite que los amastigotes de *T. cruzi* se repliquen en los macrófagos a través de una cascada bioquímica que incluye prostaglandina E2 (PGE2), TGF- β , la ornitina descarboxilasa y la síntesis de poliaminas²². Estudios experimentales han descrito que el aumento de la replicación de *T. cruzi* depende de la producción de TGF- β por los macrófagos que fagocitan las células muertas^{13a}.

De este modo, se va incrementando el daño en las estructuras de los órganos a través del tiempo, manifestándose síntomas propios de la fase crónica.

Cardiopatía Chagásica Crónica

Si este mecanismo de defensa del hospedero mamífero se mantiene en el tiempo, da lugar a la fase crónica de la enfermedad, donde la inflamación prolongada, isquemia y necrosis producto de vasoespasmos locales, genera remodelamiento cardíaco. Además, los tripomastigotes acceden a los miocitos cardíacos, invadiendo células endoteliales, células musculares lisas vasculares y áreas intersticiales de la vasculatura, siendo destruidas con formación de aneurismas apicales. También ocurre reemplazo de los cardiomiocitos a tejido fibroso, con acumulación de colágeno extracelular. Todos estos cambios llevan a alteraciones funcionales del corazón¹¹.

Como consecuencia, la forma cardíaca es la manifestación más grave y frecuente de la enfermedad. Esta se desarrolla entre 20% y 30% de los individuos y por lo general, conduce a anormalidades del sistema de conducción, bradiarritmias y taquiarritmias, aneurismas apicales, insuficiencia cardíaca, enfermedad tromboembólica y muerte súbita¹⁰.

Disfunción endotelial y daño microvascular

Debido a que la vasculatura comprende el 35% del volumen del miocardio, es razonable especular que la naturaleza de la interacción del parásito y el endotelio son importantes en la patogénesis de esta infección²³.

La disfunción endotelial se altera en enfermedades cardiovasculares y juega un papel protagónico en la regulación del tono vascular, homeostasis e inflamación vascular²⁴.

La homeostasis vascular se mantiene con un control estricto del equilibrio entre un estado vasodilatador, que a menudo se asocia con efectos antioxidantes, antiinflamatorios y antitrombóticos, por un lado y un estado vasoconstrictor en el otro, asociándose con efectos prooxidantes, proinflamatorios y protrombóticos²⁵. El estado vasodilatador está mediado por factores tales como NO•, el factor hiperpolarizante derivado del endotelio (EDHF) y prostaciclina, mientras que un estado vasoconstrictor está mediado por factores tales como la endotelina-1 (ET-1), la angiotensina II y tromboxano^{26,27}.

La infección por *T. cruzi* genera un estado vasoconstrictor en el endotelio, donde se ha observado, por lo tanto, inflamación, agregados plaquetarios y fibrina. Además, la infección de células endoteliales activa el NF-κB, promoviendo la expresión de

moléculas de adhesión celular del endotelio (E-CAMs) como la selectina endotelial (E-selectina), molécula de adhesión celular vascular (VCAM-1) y la molécula de adhesión intracelular-1 (ICAM-1)²³.

En la CCC se produce entonces daño microvascular y se activa la cascada de señalización de NF-κB, dando lugar a la expresión de citoquinas pro-inflamatorias y reclutamiento de células inflamatorias, producto del aumento de expresión de E-CAMs²³. Diversos estudios muestran que E-selectina y V-CAM-1 se encuentran elevados en pacientes con enfermedad de Chagas y además, regulan el reclutamiento de células inflamatorias, cuya persistencia determina la evolución de la cardiomiopatía chagásica²³.

Tratamiento de la enfermedad de Chagas

Hoy en día se utilizan como tratamiento etiológico de esta afección, los fármacos nifurtimox o benznidazol; los cuales provocan diversos efectos adversos en los pacientes y se ha visto que presentan eficacia limitada durante la fase crónica²⁸. Por este motivo, se ha investigado profusamente alternativas farmacológicas, con eficacia tripanocida mayor. Hasta la fecha, no se ha desarrollado ningún fármaco más eficaz que el nifurtimox o el benznidazol. Por lo tanto, una alternativa terapéutica es modificar los procesos fisiopatológicos, de manera de mejorar la terapia antiparasitaria convencional²⁹. Es así como otros fármacos, como por ejemplo las estatinas, pueden tener efectos benéficos en el tratamiento de la enfermedad de Chagas por sus características antiinflamatorias³⁰.

Las estatinas son fármacos hipolipemiantes que, adicionalmente, tienen efectos antiinflamatorios, vasodilatadores y antiagregantes plaquetarios; también, reducen el reclutamiento de células inflamatorias, disminuyen la inflamación en el endotelio vascular y la expresión de E-CAMs^{9a,31}.

Las estatinas inducen un aumento en la expresión de ciclooxigenasa 2 (COX-2) y óxido nítrico sintasa inducible (iNOS). La iNOS puede modificar a la COX-2, a través de una S-nitrosilación en la cisteína 526 de COX-2. Esto hace que COX-2 se active enzimáticamente y se produzca prostaglandina H₂ (PGH₂) y ácido 15-hidroxi-eicosatetraenoico (15-R-HETE), precursores de PGE₂ y 15-epi-LXA₄, respectivamente^{9a}. Además, las estatinas activan a la proteinkinasa A (PKA), que fosforila a la 5-Lipooxigenasa (5-LO). Estando la 5-LO fosforilada, esta no migrará desde el citoplasma a la membrana perinuclear. Si migra, interactuará con la fosfolipasa A₂ citosólica (cPLA₂) y se producirán leucotrienos. En cambio, si la 5-LO permanece en el citoplasma, interactúa con la COX-2 para generar 15-epi-lipoxinas. Así, las estatinas evitan la migración de la 5-LO para producir eicosanoides antiinflamatorios^{9a,32}.

Efectos de las estatinas sobre el reclutamiento de leucocitos

Uno de los pasos más importantes en la respuesta inflamatoria es el paso de las células inmunes de la sangre al tejido lesionado. El endotelio es una capa monocelular que recubre el interior de los vasos y proporciona una superficie no adhesiva. Alteraciones hemodinámicas persistentes o factores inflamatorios tales como IL-1 y TNF α aumentan la expresión de una variedad de moléculas de adhesión de la superficie celular, incluyendo algunas selectinas, así como la ICAM-1 y VCAM-1³³. Esto es propio

del endotelio inflamado y permite que se produzca la llamada diapédesis de leucocitos. Esta trans migración requiere del "rolling" de leucocitos en la pared del vaso a través de selectinas (E, P y L - selectina), lo que permite la activación de leucocitos por quimioquinas presentes en el endotelio celular³⁴. El acoplamiento de los receptores de quimioquinas conduce a señales intracelulares que convierten las integrinas de leucocitos de un estado de baja a alta afinidad. LFA-1 (antígeno 1 asociado a la función de linfocitos) y VLA -4, son dos receptores de integrina importantes en los leucocitos, que se unen a los ligandos ICAM-1 y VCAM-1, respectivamente. La interacción de las integrinas de leucocitos con estas moléculas de adhesión promueve la adhesión de los leucocitos a la capa del endotelio y la posterior trans migración³⁵.

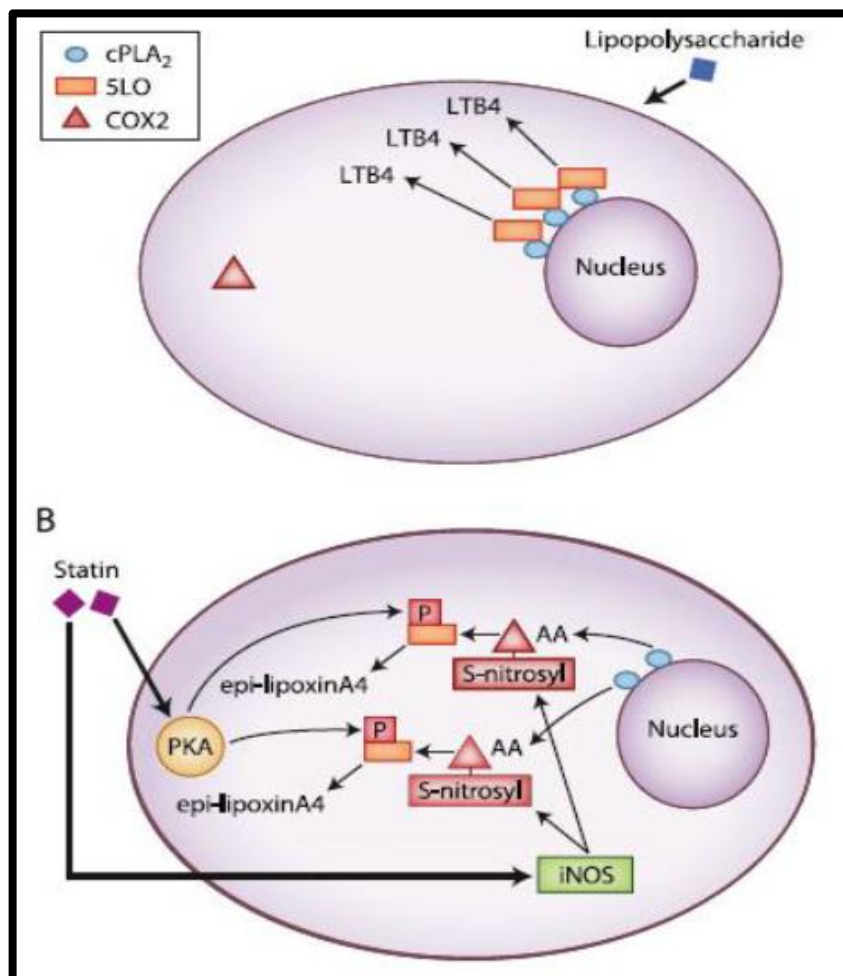


Figura 2. Ruta biosintética de 15-epi-lipoxinas. Se muestra el *switch* que generan las estatinas, activando a PKA y aumentando la actividad de la iNOS, que S-nitrosila a la COX-2 para generar el precursor 15R-HETE, el cual es clivado por la 5-LO fosforilada por PKA para generar 15-epi-LXA4^{9a}. (Birnbaum and Ye 2012).

Los efectos sobre la adhesión de leucocitos en pruebas *in vitro* indican que las estatinas regulan las moléculas que participan en todas las etapas de la cascada de adhesión endotelial. Se ha reportado que pueden reducir la expresión, inducida por la inflamación, de selectinas de plaquetas (P) y de endotelio (E) en células endoteliales³⁶ mediante el control de la liberación de óxido nítrico (NO) y las vías NF-κB, respectivamente^{35, 37}.

Asimismo, se ha descrito que los efectos de las estatinas descritos anteriormente se pueden revertir mediante la adición de ácido mevalónico o isoprenoide³⁸; sin embargo, pueden afectar la unión de LFA-1(Lymphocyte function associated antigen-1) a la ICAM-1, independientemente de la inhibición de la biosíntesis de mevalonato. Esto es debido a la capacidad de las estatinas para unirse directamente al llamado sitio de unión de lovastatina (L-sitio) en el dominio extracelular de LFA-1, que también está involucrado en la unión de ICAM-1³⁹.

Se ha reportado que, en perros, las estatinas, específicamente la simvastatina, modulan la respuesta inmune durante la fase aguda y reducen la infiltración inflamatoria en el corazón de perros infectados con *T. cruzi*; además, disminuyen los niveles séricos de citoquinas proinflamatorias durante la fase crónica y a dosis altas, modulan la producción de 15-epi-LXA4^{9b, 40}.

Tomando en cuenta lo anterior, se propone que la función endotelial, en la infección con *T. cruzi*, puede mejorar en presencia de simvastina mediante la producción de 15-epi-LXA4.

La 15-epi-LXA4 pertenece a la familia de las lipoxinas A4 (LXA4), que son mediadores de doble acción que activan vías celulares específicas para provocar efectos tanto anti-inflamatorios como pro-resolutorios⁴¹.

Varios estudios confirman que las lipoxinas actúan como mediadores antiinflamatorios mediante la inhibición de infiltración de neutrófilos. Además, inhiben su trans migración en los sitios de inflamación, a través de la inducción en la producción de óxido nítrico para suprimir las interacciones de leucocitos endoteliales⁴². Las lipoxinas también pueden inhibir la producción de citoquinas pro-inflamatorias y quimiocinas, a través de la inhibición de factores de transcripción como el factor NF- κ B^{43,44}. Igualmente, otro estudio en células endoteliales humanas, donde se investigó los efectos de LXA4 en la expresión de moléculas de adhesión y la unión de linfocitos mediada por las citoquinas, demostró que la LXA4 es capaz de bloquear citoquinas proinflamatorias tales como la interleucina-1 β (IL-1 β) y el factor de necrosis tumoral- α (TNF- α)⁴⁵. Ambas citoquinas inducen una regulación positiva de E-selectina e ICAM-1, así como también bloquean la unión de linfocitos al endotelio vascular, un fenómeno que está mediado por VCAM-1⁴⁵.

Estos resultados sugieren un papel importante para LXA4 en la regulación de los pasos críticos relacionados con la patogénesis de la CCC.

Por consiguiente, sería crucial aumentar la eficacia de los fármacos actualmente disponibles para el tratamiento etiológico de la enfermedad de Chagas, a través de la simvastina, la cual podría mejorar o prevenir algunos de los daños que se producen en la Cardiopatía Chagásica Crónica; por lo tanto se plantea que la simvastatina es capaz de disminuir la expresión de moléculas de adhesión en un modelo *in vitro* de células

endoteliales infectadas con *Trypanosoma cruzi*, mediante la inducción en la producción del eicosanoide antiinflamatorio 15-epi-LXA4 .

5. HIPÓTESIS:

La simvastatina disminuye la expresión de moléculas de adhesión en células endoteliales infectadas con *Trypanosoma cruzi*, a través de la inducción de la producción del eicosanoide antiinflamatorio 15-epi-lipoxina A4.

6. OBJETIVOS:

Objetivo general

Evaluar el efecto de simvastatina sobre la producción de moléculas de adhesión vascular en células endoteliales infectadas con *Trypanosoma cruzi*, y relacionarlo con la producción de 15-epi-lipoxina A4.

Objetivos específicos

1. Determinar la cinética de producción de 15-epi-lipoxina A4 en células endoteliales (EA.hy926) infectadas con *T. cruzi* y tratadas con simvastatina.
2. Evaluar el efecto del bloqueo de 5-lipooxigenasa, en presencia de simvastatina, sobre la expresión de moléculas de adhesión celular en células endoteliales infectadas con *T. cruzi*.
3. Evaluar el efecto directo de 15-epi-lipoxina A4 sobre la expresión de moléculas de adhesión, en células endoteliales infectadas con *T. cruzi* y compararla con el efecto de simvastatina en este mismo modelo.

7. MATERIALES Y MÉTODOS:

7.1 Materiales

La 15-epi-LXA4 y los reactivos para citometría de flujo, incluyendo anticuerpos anti-E-selectina, anti-ICAM y anti-VCAM humanos se obtuvieron de Cayman Chemical (Cayman, USA) y la simvastatina, AA-861, los medios de cultivo y otros reactivos se obtuvieron de Sigma-Aldrich.

Los tripomastigotes de *T. cruzi*, clon Dm28c, se obtuvieron de cultivos celulares infectados en el laboratorio de Bioquímica, Metabolismo y Resistencia a Fármacos, dirigido por el Dr. Juan Diego Maya, manteniendo una relación con las células de 1:10. Los cultivos celulares corresponden a células EA.hy926, y los cultivos están dedicados exclusivamente para obtener tripomastigotes.

La línea celular EA.hy926 corresponde a células de endotelio humano que presentan funciones características, como producción de endotelina I⁴⁶, prostaciclina⁴⁷ y moléculas de adhesión⁴⁸ y mantienen la capacidad de interactuar con leucocitos⁴⁸. Se cultivaron en Iscove's Modified Dulbecco's Medium (IMDM) con 10% de suero fetal bovino, en presencia de 100 U/ml de penicilina G y 100 mg/ml de estreptomina sulfato a 37°C con CO₂ al 5%.

7.2 Métodos

7.2.1 Cultivos celulares:

Se utilizaron células EA.hy926, que presentan funciones características de células de endotelio humano. Se cultivaron en Iscove's Modified Dulbecco's Medium (IMDM) con 10% de suero fetal bovino, en presencia de 100 U/mL de penicilina G y 100 mg/mL de Estreptomicina sulfato a 37°C con CO₂ al 5%. Se sembraron en placas de 6 pocillos y 12 pocillos.

7.2.2 Análisis de viabilidad celular:

La viabilidad celular se determinó mediante un ensayo de determinación de anexina- V e incorporación de Ioduro de propidio. Se sembraron 15×10^4 células EA.hy926 en una placa de 12 pocillos y se mantuvieron con medio fresco durante 24 horas. Posteriormente se lavaron e incubaron con concentraciones crecientes del inhibidor de 5-LO, AA-861, (1, 25 y 50 μM) durante 24 horas. Luego de retirar el tratamiento, las células fueron lavadas en frío con PBS y retiradas con EDTA; se realizaron dos centrifugaciones y lavados y se resuspendieron en tampón de unión de anexina 1X (1×10^6 cel/ml de tampón). A cada suspensión celular de 100 μl se agregó 5 μl de Alexa flúor y 1 μl de PI (Ioduro de propidio) solución de trabajo; luego se dejó incubando durante 15 min a T° ambiente. Posteriormente, se agregó 400 μl de tampón de unión de anexina 1X, y se homogenizó suavemente, manteniéndose en hielo hasta su análisis por citometría de flujo.

7.2.3 Determinación de 15-epi-lipoxina A4 en sobrenadante de cultivos de células endoteliales infectadas con *T. cruzi*.

Para determinar la cinética de producción de 15-epi-LXA4 en células endoteliales (EA.hy926) no infectadas o infectadas con *T. cruzi* y tratadas con simvastatina, se realizó el siguiente procedimiento:

Al alcanzar las células una confluencia del 60-70% en el cultivo, se retiró el medio de cultivo y se añadió medio fresco con los parásitos cuando corresponde, en una relación 1:10, permitiendo la interacción con las células pretratadas durante 16 horas. Posteriormente, se incubaron con simvastatina 5 μ M a tiempos 0, 3, 6, 12 y 24 horas tomando a estos tiempos el sobrenadante de los cultivos para cuantificar la presencia de 15-epi-LXA4, mediante la técnica de ELISA. Este ensayo se basa en la competencia entre un conjugado enzimático y 15-epi-LXA4 en la muestra para un número limitado de sitios de unión. El procedimiento se realizó con un kit (US Biologicals® Salem, MA) de acuerdo a las instrucciones del fabricante. Los resultados cuantitativos se obtuvieron mediante la medición y la comparación de la lectura de absorbancia de los pocillos de las muestras frente a los estándares con un lector de microplacas a 650 nm. El grado de desarrollo de color es inversamente proporcional a la cantidad de 15-epi-LXA4 en la muestra o estándar. Por ejemplo, la ausencia de 15-epi-LXA4 en la muestra dará lugar a un color azul brillante, mientras que la presencia de 15-epi-LXA4 tendrá como resultado el desarrollo de poco o nada de color.

7.2.4 Detección de moléculas de adhesión en células endoteliales infectadas con *T. cruzi*.

Se sembraron 3×10^5 células EA.hy926 en placas de 6 pocillos y se mantuvieron con medio fresco durante 12 horas, luego fueron lavadas y las células se incubaron en presencia de simvastatina 5 μM , inhibidor AA-861 a concentración de 25 y 50 μM , AA-861 de 25 μM o 50 μM más simvastatina 5 μM , 15-epi-LXA4 de 1, 10, 100 nM o aspirina de 0,125 mM según corresponda, durante 24 horas. Se utilizaron como control negativo células sin ningún tratamiento y sin infectar y como control positivo células tratadas con TNF α (20 ng/ml). Posteriormente se lavaron suavemente y fueron puestas en contacto con parásitos aislados de *T. cruzi* en una relación célula-parásito de 1:10 durante 16 horas. Después de lavar con PBS 1X frío, se desprendieron con una solución de EDTA-PBS 1X a 0,5 mM, y tras lavarlas 2 veces con *Buffer Staining flow cytometry* frío, se incubaron con un anticuerpo monoclonal de ratón conjugado a PE contra E-selectina, anticuerpo monoclonal de ratón conjugado a FITC contra ICAM-1 y un anticuerpo monoclonal de ratón conjugado a APC contra VCAM-1 simultáneamente durante 30 minutos. La fluorescencia asociada a la superficie celular fue detectada por citometría de flujo usando un equipo *FACSaria III (BD technologies)*.

7.2.5 Análisis estadístico de los datos

Tomando en consideración que se estudió el bloqueo de la producción de 15-epi-LXA4 y sus respectivos controles no sometidos a tratamiento, las comparaciones se realizaron a través de la prueba de ANOVA con pruebas post hoc Dunnett's y Tukey's. El análisis de varianza se realizó con ANOVA de una vía (one-way ANOVA), ya que en algunos casos son más de tres grupos experimentales, seguido de un test de Tukey's

para múltiples comparaciones, cuando fue necesario se realizaron múltiples comparaciones a través de t de Student. Los resultados fueron expresados como promedios \pm SEM de al menos tres experimentos independientes. El $n=3$ corresponde al mínimo número de experimentos requeridos para tener un 95% de confianza, dada la variabilidad de los estudios in vitro propuestos. La significancia estadística se determinó con un valor de $p<0.05$. Todos los análisis estadísticos se realizaron en el software Prism 5 for Windows (GraphPad Software, Inc)

8. RESULTADOS

Objetivo 1. Determinar la cinética de producción de 15-epi-LXA4 en células endoteliales (EA.hy926) infectadas con *T. cruzi* y tratadas con simvastatina.

Cinética de producción de 15 epi-lipoxina A4 en células endoteliales EA.hy926.

En primer lugar, se determinó el efecto de la simvastatina sobre la producción de 15-epi-LXA4 en células EA.hy926 sin infectar. En la figura 3 se observa que los niveles de 15-epi-LXA4 comienzan a aumentar a partir de las 6 horas de incubación con simvastatina, alcanzando la máxima producción a las 24 horas. Sin embargo, los niveles alcanzados no son muy altos.

En contraste, cuando se determinó el efecto de simvastatina sobre la producción de 15-epi-LXA4 en células EA.hy926 infectadas con tripomastigotes de *T. cruzi*, se pudo apreciar un incremento significativo, dependiente del tiempo de incubación, en la producción de este eicosanoide (figura 3). Lo más interesante es que los niveles de 15-epi-LXA4 fueron más altos en el modelo infectado en comparación con las células sanas. Lo anterior indica que la presencia de una noxa proinflamatoria es esencial para que la simvastatina pueda gatillar la producción de cantidades significativas de 15-epi-LXA4. Es necesario añadir que en estos experimentos se utilizó una concentración de 5 μ M de simvastatina, pues se ha observado que a concentraciones mayores induce citotoxicidad en células EA.hy926 (datos no mostrados).

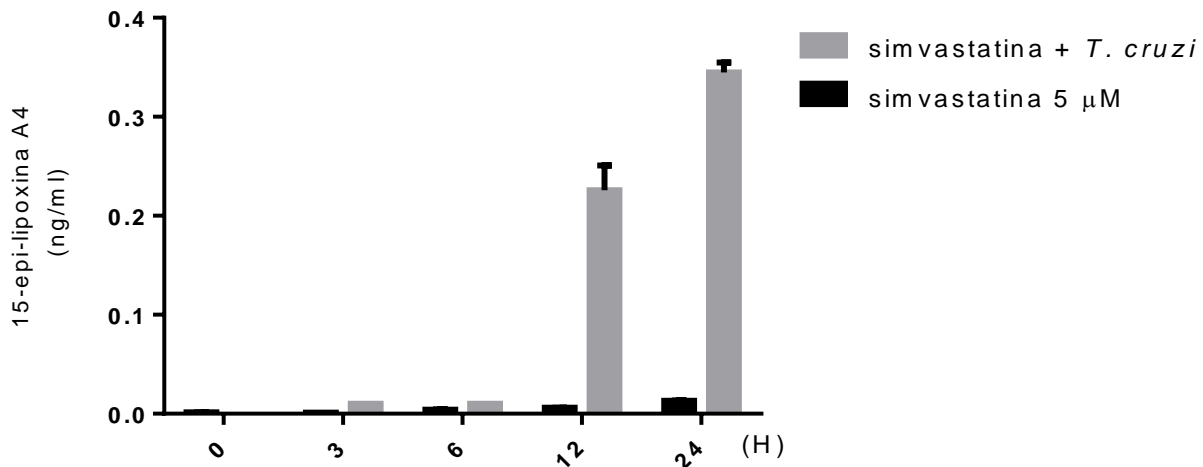


Figura 3. Inducción de la producción de 15-epi-lipoxina A4 en células EA.hy926 sin infectar o infectadas con *Trypanosoma cruzi* y tratadas con simvastatina. La concentración de 15-epi-LXA4 se determinó en un ensayo de cELISA, luego de incubar células EA.hy926 infectadas con tripomastigotes en una relación célula-parásito 1:10, durante 16 horas y posteriormente incubadas con simvastatina 5 µM durante 0, 3, 6, 12 y 24 horas o células sin infectar e incubadas con simvastatina 5 µM durante 0, 3, 6, 12 y 24 horas. Se tomaron muestras del sobrenadante a los tiempos indicados en la figura para la determinación de los niveles de 15-epi-lipoxina A4 como se describe en metodología. Los datos se expresan como la media +/- SEM. El análisis estadístico se realizó mediante la prueba de t de Student de múltiples comparaciones, indicando diferencias significativamente estadísticas entre simvastatina v/s simvastatina + *T. cruzi* ($P < 0,05$)

Objetivo 2. Evaluar el efecto del bloqueo de 5-lipooxigenasa, en presencia de simvastatina, sobre la expresión de moléculas de adhesión celular en células endoteliales infectadas con *T. cruzi*

Expresión de E-CAMs en un modelo de activación endotelial.

El TNF- α es una citoquina involucrada en muchas reacciones inflamatorias. No sólo responden a este estímulo células del sistema inmune sino también otras células como las células endoteliales. Por lo que constituye un excelente modelo de activación endotelial y permite garantizar que las células EA.hy926 usadas en los ensayos de expresión de moléculas de adhesión efectivamente responden a estímulos inflamatorios

mediante la expresión de moléculas de adhesión. En la figura 4 se aprecia activación endotelial, marcada por un significativo aumento de la expresión de E-selectina, VCAM-1 e ICAM-1 a las 16 horas de incubación con 20 ng/ml de TNF- α . Previamente, en el laboratorio se estableció que el máximo incremento en la expresión de moléculas de adhesión en este tipo celular ocurre a las 16 horas y se mantiene en este nivel hasta por 36 horas (datos no mostrados).

Efecto de simvastatina sobre la expresión de ECAMs en células infectadas con *T. cruzi*.

De manera similar a lo observado con TNF- α , las células endoteliales se activaron con la infección con tripomastigotes de *T. cruzi*. Así, en la figura 5 se puede apreciar que la incubación con simvastatina 5 μ M, administrada antes de inducir la infección con *T. cruzi*, fue capaz de disminuir significativamente la expresión de ICAM-1. Sin embargo, y de manera inesperada, no se afectó la expresión de E-selectina ni de VCAM-1. Se usó aspirina 0.125 mM como control positivo, pues se describió que este fármaco disminuye la expresión de ICAM; sin embargo, este resultado fue reportado en macrófagos y no en células endoteliales⁴⁹.

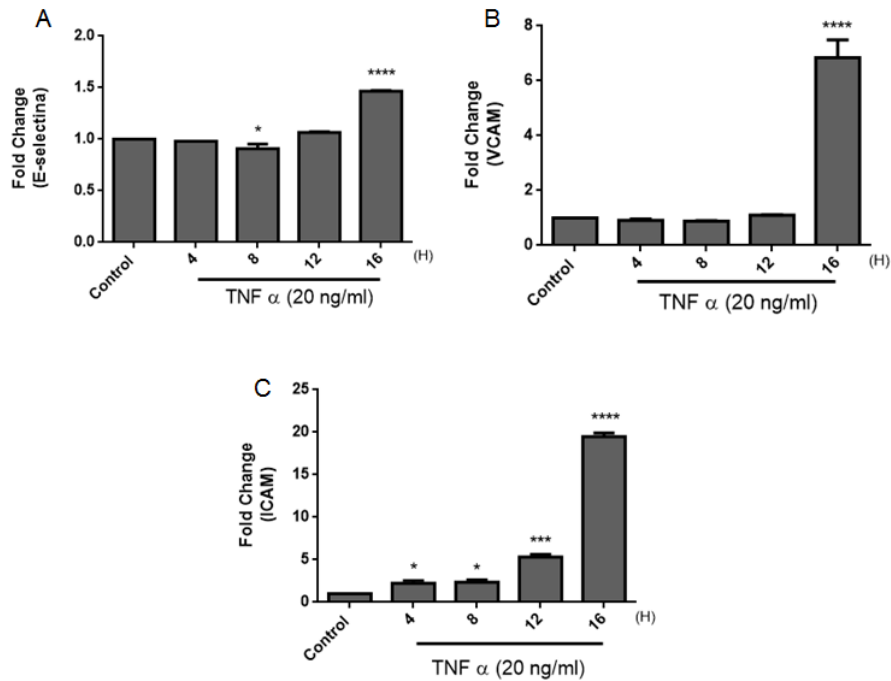


Figura 4. TNF- α induce la expresión de moléculas de adhesión celular en células endoteliales EA-hy926. Las células EA-hy926 fueron incubadas durante 16 horas con TNF α (20 ng/ml) y se extrajeron muestras a los tiempos indicados en la figura para determinación de E-selectina (A), VCAM-1 (B) e ICAM-1 (C) por citometría de flujo. Los datos corresponden a la normalización usando el promedio \pm SEM de la intensidad de fluorescencia media para cada marcador en base al control y corresponden a los duplicados de tres experimentos independientes. Las comparaciones se realizaron mediante ANOVA de una vía y post test de Dunnett's (*P<0,5; ***p<0,01; ****p<0,001 v/s control).

Dado que la actividad de 5-LO es esencial para la producción de 15-epi-LXA4, fue necesario evaluar la consecuencia de la inhibición de esta enzima sobre la expresión de moléculas de adhesión y así vincular el efecto de 15-epi-LXA4 con la expresión de moléculas de adhesión en células EA.hy926 en presencia de simvastatina. El efecto de la inhibición de 5-LO con AA-861 en un modelo celular no activado, tratado con simvastatina (Figura 6), no provocó cambios significativos en la expresión basal de las moléculas de adhesión E-selectina, VCAM-1 e ICAM-1. Si llama la atención que al

inhibir la actividad de 5-LO, en un modelo activado con *T. cruzi*, sólo se revirtió el efecto sobre la expresión de ICAM-1 (figura 5). Es necesario indicar que AA-861 no afecta la viabilidad de las células endoteliales EA.hy926 a las concentraciones usadas en estos experimentos (figura 7). El análisis de viabilidad se realizó analizando la incorporación de yoduro de propidio (IP) y la marcación de fosfatidilserina en la superficie de la membrana celular mediante anexina V. La incorporación de yoduro de propidio permite determinar la integridad de la membrana y evaluar si hay daño por necrosis celular, mientras que la determinación de fosfatidilserina permite evaluar si el fármaco induce muerte por apoptosis.

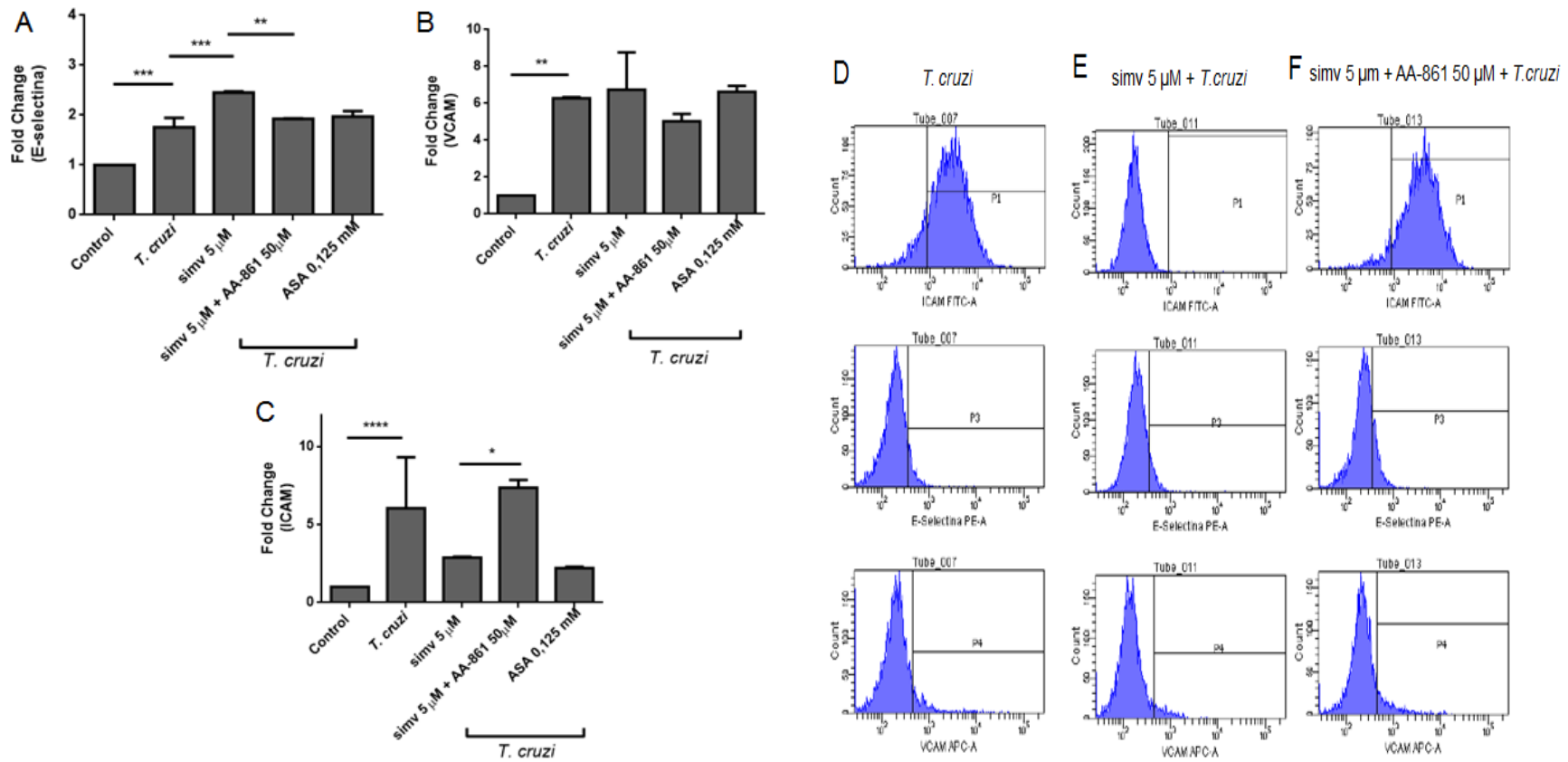


Figura 5. La simvastatina disminuye los niveles de ICAM en células endoteliales activadas con *T. cruzi*, en un proceso dependiente de la actividad de 5-Lipooxigenasa. Se incubaron células EA-hy926 con simvastatina (simv), AA-861 y aspirina a las concentraciones indicadas en la figura, durante 24 horas. Posteriormente se infectaron con tripomastigotes de *T. cruzi* de la cepa Dm28c (en una relación 1:10) durante 16 horas. La expresión de E-selectina (A), VCAM-1 (B) e ICAM-1 (C) se determinó por análisis FACS. Los datos corresponden a la normalización usando el promedio \pm SEM de la intensidad de fluorescencia media para cada marcador en base al control y corresponden a los duplicados de tres experimentos independientes. Las comparaciones se realizaron mediante análisis de ANOVA de una vía y post test de Tukey's (* $p < 0,5$; ** $P < 0,1$; *** $P < 0,01$; **** $P < 0,001$). Histogramas representativos de la citometría de flujo que muestran el efecto de la activación endotelial (D), tratamiento con simvastatina 5 μ M (E) y simvastatina en combinación con AA-861 (F), para cada una de las tres moléculas de adhesión analizadas y que fueron la base del análisis presentado en A, B y C.

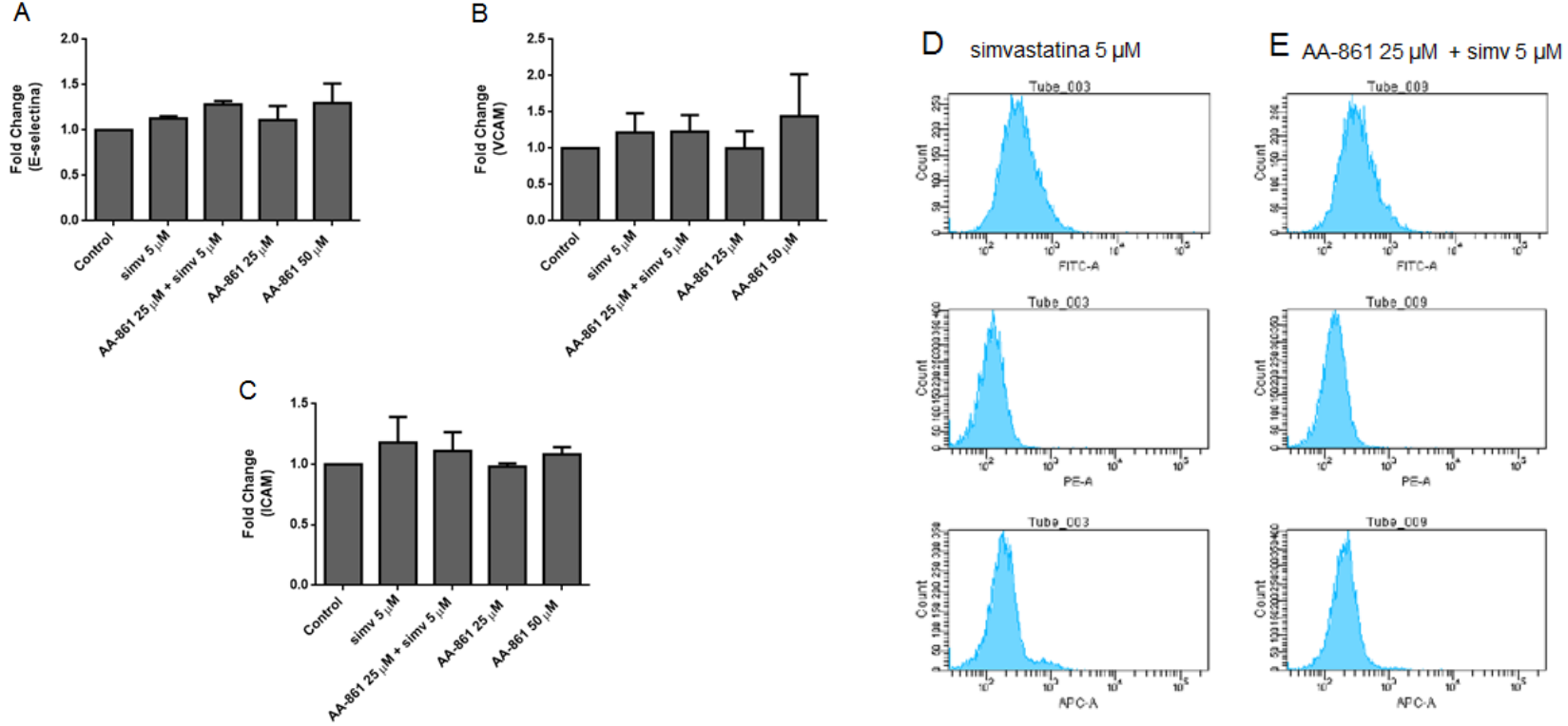


Figura 6. La simvastatina no afecta la expresión de moléculas de adhesión en células endoteliales en reposo. Las células EA-hy926 se incubaron durante 24 horas con simvastatina (simv) 5 μ M, el inhibidor de 5-LO, AA-861 a 25 y 50 μ M y la combinación de AA-861 y simvastatina a 25 μ M y 5 μ M, respectivamente. La expresión de E-selectina (A), VCAM-1 (B) e ICAM-1 (C) se determinó mediante análisis por citometría de flujo. Se presentan los histogramas representativos para simvastatina 5 μ M (D) y la combinación de simvastatina y AA-861 (E). Los datos corresponden a la normalización usando el promedio \pm SEM de la intensidad de fluorescencia media para cada marcador en base al control y corresponden a los duplicados de tres experimentos independientes. Las comparaciones fueron realizadas por ANOVA de una vía.

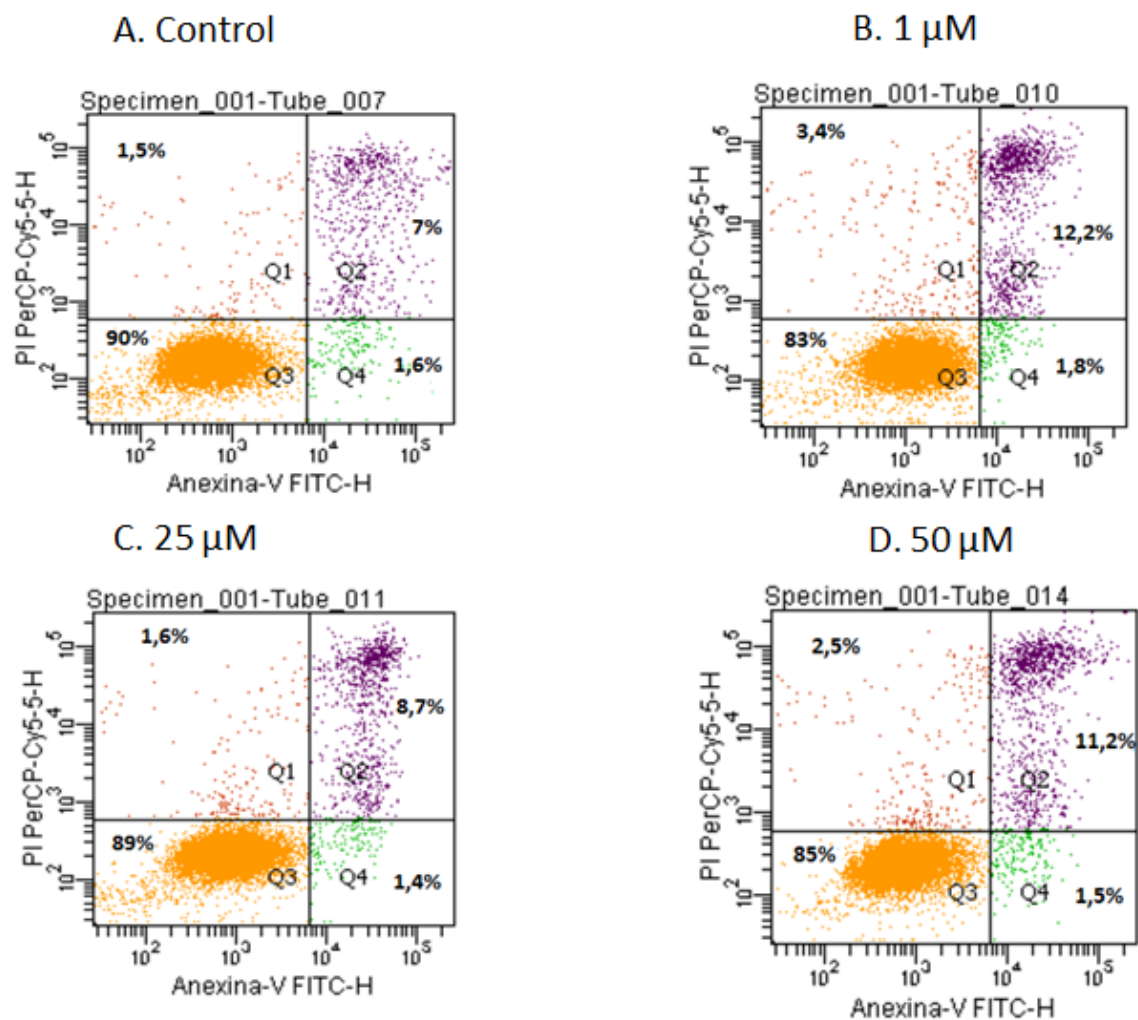


Figura 7. La inhibición de 5-Lipooxigenasa con AA-861 no afecta la viabilidad de células endoteliales EA.hy926. Se presenta los paneles representativos del recuento de eventos mediante citometría de flujo correspondientes a cada uno de los análisis realizados: en el eje Y se grafican los eventos correspondientes a células que incorporan o no ioduro de propidio. En el eje X se grafican los eventos correspondientes a Anexina V. Las células marcadas con Anexina V (-) PI (+) se muestran en el área de Q1; células marcadas con Anexina V (+) PI (+) se muestran en el área de Q2; células marcadas con Anexina V (-) PI (-) se muestran en el área de Q3; células marcadas con Anexina V (+) PI (-) se muestran en el área de Q4. La figura es representativa de tres experimentos independientes. Las células endoteliales EA.hy926 se incubaron durante 24 horas con AA-861 a 0 μ M (A), 1 μ M (B), 25 μ M (C) y 50 μ M (D).

Efecto de simvastatina y de concentraciones crecientes del inhibidor de 5-LO (AA-861) en células endoteliales EA.hy926 infectadas con *T. cruzi*

Tomando en cuenta que el experimento de la figura 5 se realizó con una sola concentración del inhibidor de 5-LO, explicando así la ausencia de efecto sobre la expresión de E-selectina y de VCAM-1, se decidió evaluar si a concentraciones mayores de AA-861 se presenta el efecto esperado. No obstante, los resultados fueron consistentes con lo observado anteriormente. Es decir, sólo se revierte el efecto de simvastatina 5 μM con AA-861, a concentraciones de 25 y 50 μM , sobre la expresión de ICAM-1 (figura 8C). Sin embargo a concentración de 100 μM este efecto desaparece. Por razón de solubilidad, no se pudo evaluar concentraciones mayores de 100 μM del inhibidor. Interesantemente, se aprecia una tendencia, dependiente de la concentración, de inducir un incremento en la expresión de E-selectina y VCAM-1 (Figura 8A y 8B). Sin embargo, aunque estadísticamente significativo, el valor del incremento no es mayor a dos veces, por lo que probablemente es un efecto visual del gráfico.

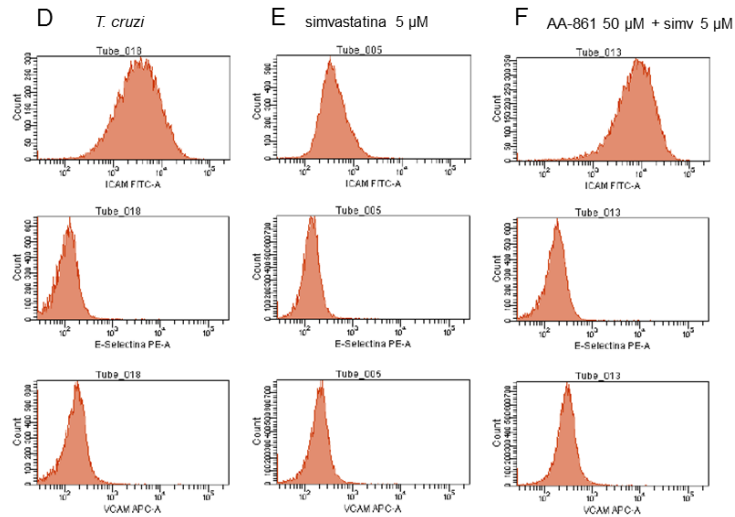
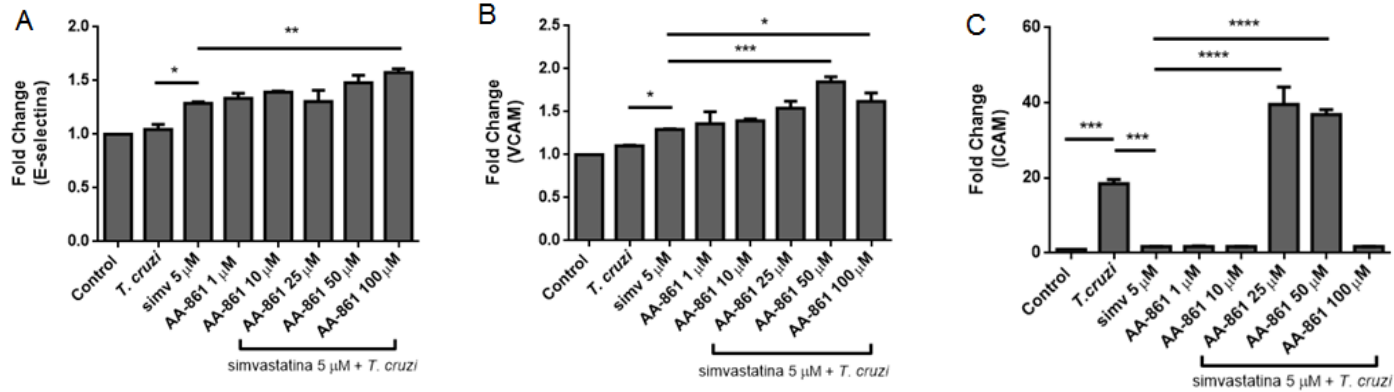


Figura 8. Efecto de la combinación de simvastatina con concentraciones crecientes del inhibidor de 5-LO sobre la expresión de moléculas de adhesión celular. Se incubaron, durante 24 horas, células EA.hy926 con simvastatina (simv) 5 µM y concentraciones crecientes de AA-861, inhibidor de 5-LO. Posteriormente, las células se infectaron con tripomastigotes de *T. cruzi* de la cepa Dm28c (en una relación 1:10) durante 16 horas. La expresión de E-selectina (A), VCAM-1(B) e ICAM-1 (C) se determinó por análisis FACS. Los datos corresponden a la normalización usando el promedio +/- SEM de la intensidad de fluorescencia media para cada marcador en base al control y corresponden a los duplicados de tres experimentos independientes. Las comparaciones se realizaron mediante análisis de ANOVA de una vía y post test de Tukey's (* p<0,5; **P<0,1; *** P<0,01; **** P<0,001). Histogramas representativos de la citometría de flujo que muestran el efecto de la activación endotelial (D), tratamiento con simvastatina 5 µM (E) y simvastatina en combinación con AA-861 50 µM (F), para cada una de las tres moléculas de adhesión analizadas y que fueron la base del análisis presentado en A, B y C.

Objetivo 3. Evaluar el efecto directo de 15-epi-lipoxina A4 sobre la expresión de moléculas de adhesión, en células endoteliales infectadas con *T. cruzi* y compararla con el efecto de simvastatina en este mismo modelo.

Efecto de 15 epi-lipoxina A4 en células endoteliales EA.hy926 infectadas con *T. cruzi*

Como se ha descrito en la literatura, parte de los efectos pleiotrópicos de las estatinas, incluyendo a simvastatina, incluye acciones antiinflamatorias que pueden estar mediadas por 15-epi-LXA4. Así, la administración exógena de 15-epi-LXA4 puede mimetizar algunos de los efectos de simvastatina. Para evaluar esta posibilidad, se estudió el efecto de este eicosanoide sobre la expresión de moléculas de adhesión en células activadas con *T. cruzi*. De esta manera, se incubaron células EA.hy926 con concentración crecientes de 15-epi-LXA4 y posteriormente se infectaron con *T. cruzi*. Como se puede apreciar en la figura 9, la 15-epi-LXA4 no afectó la expresión de E-selectina (figura 9A) ni de VCAM-1 (figura 9B). Sin embargo el efecto sobre la expresión de ICAM-1 (figura 9C) fue muy similar al observado con simvastatina y con aspirina. Es importante hacer notar que no se aprecia un efecto dependiente de la concentración. Es posible que a concentración de 1 ng/ml, se alcanza el efecto máximo de 15-epi-LXA4.

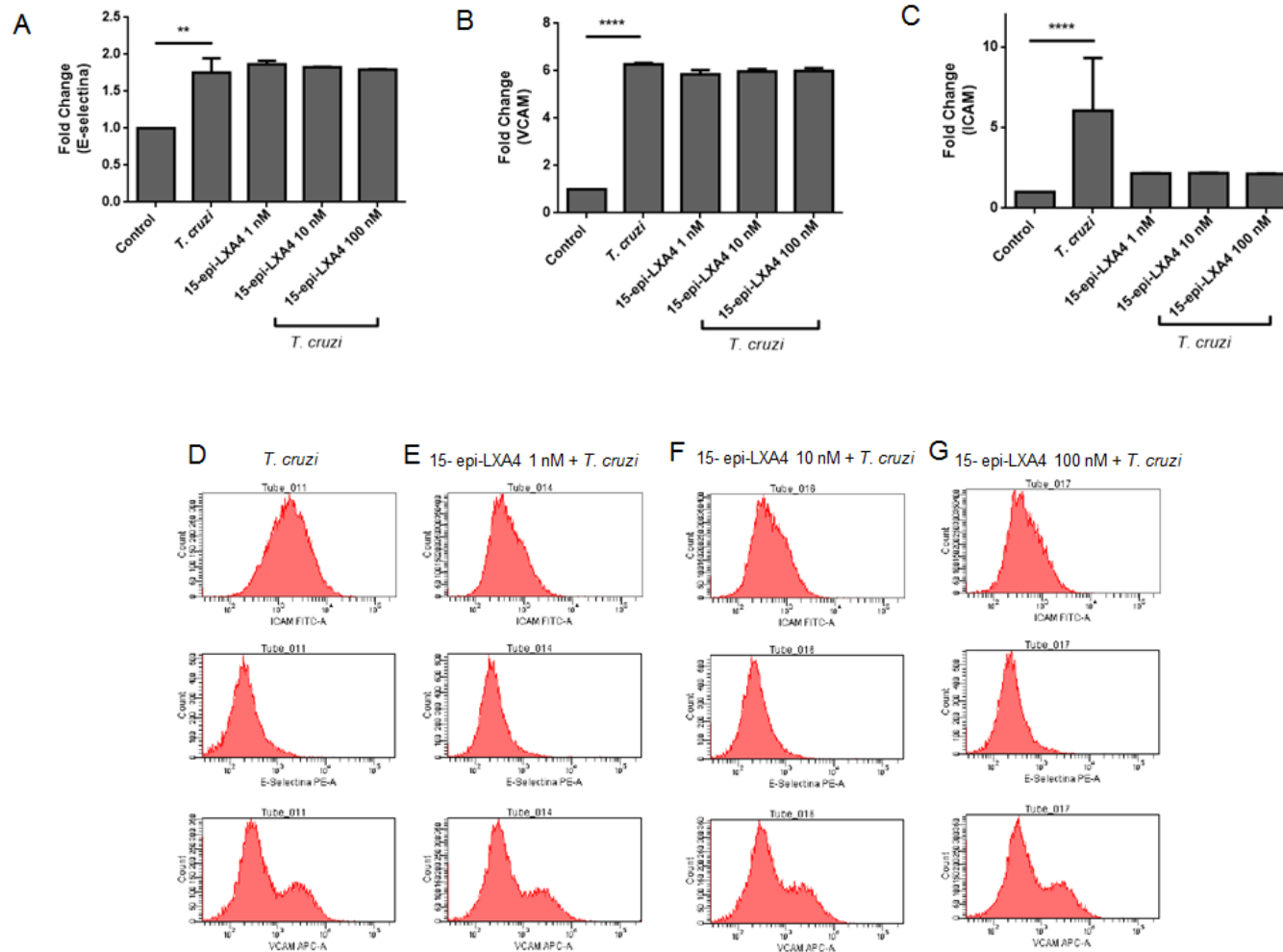


Figura 9. Efecto de 15-epi-lipoxina A4 sobre la expresión de moléculas de adhesión celular. Se incubaron, durante 24 horas, células EA.hy926 con concentraciones crecientes de 15-epi-LXA4. Posteriormente, las células se infectaron con tripomastigotes de *T. cruzi* de la cepa Dm28c (en una relación 1:10) durante 16 horas. La expresión de E-selectina (A), VCAM-1 (B) e ICAM-1 (C) se determinó por análisis FACS. Los datos corresponden a la normalización usando el promedio +/- SEM de la intensidad de fluorescencia media para cada marcador en base al control y corresponden a los duplicados de tres experimentos independientes. Las comparaciones se realizaron mediante análisis de ANOVA de una vía y post test de Tukey's (**P<0,1; **** P<0,001). Histogramas representativos de la citometría de flujo que muestran el efecto de la activación endotelial (D), y tratamiento con 15-epi-LXA4 a 1 nM (E), 10 nM (F) y 100 ng/ml (G), para cada una de las tres moléculas de adhesión analizadas y que fueron la base del análisis presentado en A, B y C.

9. Discusión y conclusiones

El inhibidor de la HMG-CoA reductasa o estatinas, son altamente eficientes en la reducción de los niveles séricos de colesterol en pacientes con hipercolesterolemia y como tales son los fármacos de elección en enfermedades cardiovasculares relacionadas con lípidos⁵⁰. Las estatinas tienen efectos antiinflamatorios, un ejemplo de los cuales es que disminuye en células endoteliales la expresión de moléculas de adhesión (CAMs)⁵¹. Por otro lado, el reclutamiento y activación de células inflamatorias dependen de procesos de comunicación célula-célula y están fuertemente regulados por las CAMs, expresadas en la superficie del endotelio vascular. Hay evidencia que la expresión de E-CAMs aumenta durante la infección por *T. cruzi* y refleja la severidad o la etapa de la enfermedad chagásica, regulando el reclutamiento de células inflamatorias, cuya persistencia determina la evolución de la cardiomiopatía chagásica²³.

En el presente trabajo se observó que la simvastatina es capaz de inducir una leve producción de 15-epi-XA4 en células EA. hy926 en reposo. No obstante, cuando se produce un estímulo proinflamatorio, como el inducido por la infección intracelular con *T. cruzi*^{3,52}, la simvastatina induce una alta producción de 15-epi-LXA4, alcanzando su máximo a las 24 horas. Esta diferencia indica que es necesario un estado inflamatorio para garantizar la suficiente producción de 15-epi-lipoxina A4 y por lo tanto confirma lo que algunos autores proponen, que las estatinas producen un potente eicosanoide antiinflamatorio denominado 15-epi-LXA4 y que, a través de este, se reduciría la inflamación^{9a}. Sin embargo, los mecanismos moleculares por los cuales induciría este aumento aún no están completamente revelados y requieren una mayor comprensión e investigaciones futuras.

Aunque en estricto rigor las células endoteliales no son parte del sistema inmune, si presentan respuestas específicas ante estímulos proinflamatorios. De hecho, la disfunción endotelial cuenta de numerosos procesos inflamatorios como aterosclerosis⁵³, enfermedad inflamatoria gastrointestinal⁵⁴ y asma⁵⁵. En estos procesos, la activación de las células endoteliales, ante estímulos específicos, provoca múltiples respuestas intracelulares⁵³ que culminan con la expresión de moléculas de adhesión vascular⁵⁶, entre otro efectos.

En efecto, la aplicación de TNF- α (20 ng/ml) indujo la expresión de moléculas de adhesión, alcanzando su máximo a las 16 horas de incubación. Esto último es importante, pues la cinética de expresión de ECAMs puede variar dependiendo del tipo celular. Por ejemplo, en células HUVEC estimuladas con TNF α , la expresión máxima de VCAM y de E-selectina se alcanza a las 8-16 horas de producido el estímulo, y entre 12 y 24 horas para ICAM-1⁵⁷. Por lo mismo, el tiempo de infección con *T. cruzi* fue fijado a las 16 horas.

La nitrosilación de la ciclooxigenasa inducida por estatinas, produce 15-R-HETE, sustrato de 5-LO para producir 15-epi-LXA4^{9a}. La actividad de esta ruta metabólica puede ser modificada al inhibir 5-LO con AA-861⁵⁸, y en consecuencia, impedir la modulación de la activación endotelial por estatinas. No obstante, el efecto esperado sólo se pudo apreciar con la expresión de ICAM-1, tanto en los ensayos directos con simvastatina (figura 5) como en los ensayos de inhibición (figura 8). Esta situación se repite cuando se administra 15-epi-LXA4 (figura 9).

La inmovilización de las células inflamatorias al endotelio vascular es el paso inicial en una cascada de acontecimientos que finalmente conduce a la migración celular hacia sitios de lesión o infección. Esta primera etapa está mediada por la interacción entre la E-selectina y P-selectina, que se expresan en células endoteliales activadas, y una variedad de glicoproteínas y glicolípidos potencialmente expresados en la superficie de los leucocitos⁵⁹. La inmovilización es seguida por el "rolling" de los leucocitos, activación y detención. Mientras que la inmovilización inicial y las interacciones de "rolling" están mediados en gran medida por las selectinas, la unión a integrinas contribuyen a la detención de los leucocitos en el endotelio⁶⁰. En la vasculatura, la infiltración se asocia con aumento de la expresión de moléculas de adhesión, incluyendo VCAM-1 e ICAM-1⁶¹. ICAM-1 es importante para el reclutamiento de linfocitos y por lo tanto, participa en los procesos de daño tisular. Adicionalmente, la expresión de las moléculas de adhesión puede estar influida por la producción de moléculas antiinflamatorias como por ejemplo, lipoxinas⁶². En el presente trabajo, se ha observado el vínculo existente entre la producción de moléculas de adhesión, particularmente ICAM-1, ante estímulos pro-inflamatorios como TNF- α o la infección por *T. cruzi* y la modulación producida por la administración de simvastatina. Además, el efecto inducido por este fármaco se replicó ante la administración de 15-epi-lipoxina A4. La vinculación entre simvastatina y la disminución de la expresión de ICAM-1 se hizo más evidente cuando se inhibió la actividad de 5-LO. Aunque hay reportes que muestran un efecto general de las estatinas sobre E-selectina, VCAM-1 e ICAM-1, es posible que estemos evidenciando, por primera vez, un efecto selectivo sobre ICAM y no un fenómeno más amplio sobre todas las moléculas de adhesión. De hecho este mismo resultado ha sido visto previamente en el laboratorio, cuando se trata con aspirina ratones infectados con *T.*

cruzi, aunque el efecto más significativo se observó sobre la expresión de E-selectina. Es necesario en todo caso, ahondar en los mecanismos moleculares que explican esta aparente selectividad, pero por otro lado, este trabajo demuestra el efecto en un modelo *in vitro* de un fármaco ampliamente usado y que, en potencia, podría tener utilidad para prevenir las alteraciones de la CCC.

10. REFERENCIAS

1. WHO. Working to overcome the global impact of neglected tropical diseases: first WHO report on neglected tropical diseases : update 2011. World Health Organization: Geneva, 2011; p viii, 14 p.
2. Marin-Neto JA, Cunha-Neto E, Maciel BC, Simoes MV. Pathogenesis of chronic Chagas heart disease. *Circulation* 2007; 115 (9): 1109-23.
3. Rossi MA y Cols. Coronary microvascular disease in chronic Chagas cardiomyopathy including an overview on history, pathology, and other proposed pathogenic mechanisms. *PLoS Negl Trop Dis* 2010; 4 (8).
4. Huang H y Cols. Infection of endothelial cells with *Trypanosoma cruzi* activates NF-kappaB and induces vascular adhesion molecule expression. *Infect Immun* 1999; 67 (10): 5434-40.
5. (a) Alvarez MG, Vigliano C, Lococo B, Petti M, Bertocchi G, Viotti R. Seronegative conversion after incomplete benznidazole treatment in chronic Chagas disease. *T Roy Soc Trop Med H* 2012; 106 (10): 636-638; (b) Santos FM y Cols. Cardiomyopathy prognosis after benznidazole treatment in chronic canine Chagas' disease. *J Antimicrob Chemoth* 2012; 67 (8): 1987-1995.
6. Liu M, Wang F, Wang YR, Jin RM. Atorvastatin Improves Endothelial Function and Cardiac Performance in Patients with Dilated Cardiomyopathy: The Role of Inflammation. *Cardiovasc Drug Ther* 2009; 23 (5): 369-376.
7. Lee YM y Cols. Cyclic nucleotides and mitogen-activated protein kinases: regulation of simvastatin in platelet activation. *Journal of biomedical science* 2010; 17.
8. (a) Stach K y Cols. Simvastatin and atorvastatin attenuate VCAM-1 and uPAR expression on human endothelial cells and platelet surface expression of CD40 ligand. *Cardiology Journal* 2012; 19 (1): 20-28. (b) Yang JCS, Huang F, Wu CJ, Chen YC, Lu TH, Hsieh CH. Simvastatin reduces VCAM-1 expression in human umbilical vein endothelial cells exposed to lipopolysaccharide. *Inflammation Research* 2012; 61 (5): 485-491.
9. (a) Birnbaum Y, Ye Y. Pleiotropic effects of statins: the role of eicosanoid production. *Curr Atheroscler Rep* 2012; 14 (2): 135-9; (b) Spite M, Serhan CN. Novel Lipid Mediators Promote Resolution of Acute Inflammation Impact of Aspirin and Statins. *Circulation research* 2010; 107 (10): 1170-1184.
10. Rassi A Jr, Rassi A, Marin-Neto JA. Chagas disease. *Lancet* 2010; 375 (9723): 1388-402.
11. Machado FS y Cols. Chagas Heart Disease Report on Recent Developments. *Cardiol Rev* 2012; 20 (2): 53-65.
12. Muñoz-Saravia SG, Haberland A, Wallukat G, Schimke I. Chronic Chagas' heart disease: a disease on its way to becoming a worldwide health problem: epidemiology, etiopathology, treatment, pathogenesis and laboratory medicine. *Heart Fail Rev* 2012; 17 (1): 45-64.
13. (a) DosReis GA. Evasion of immune responses by *Trypanosoma cruzi*, the etiological agent of Chagas disease. *Braz J Med Biol Res* 2011; 44 (2): 84-90. (b) Ribeiro AL, Nunes MP, Teixeira MM, Rocha MO. Diagnosis and management of Chagas disease and cardiomyopathy. *Nat Rev Cardiol* 2012.
14. Vieira PM y Cols. Different infective forms trigger distinct immune response in experimental chagas disease. *PLoS One* 2012; 7 (3): e32912.
15. Guilmot A, Carlier Y, Truyens C. Differential IFN-gamma production by adult and neonatal blood CD56+ natural killer (NK) and NK-like-T cells in response to *Trypanosoma cruzi* and IL-15. *Parasite Immunol* 2014; 36 (1): 43-52.
16. Talvani A, Teixeira MM. Inflammation and Chagas disease some mechanisms and relevance. *Adv Parasitol* 2011; 76: 171-94.
17. Dhiman M y Cols. Increased Myeloperoxidase Activity and Protein Nitration Are Indicators of Inflammation in Patients with Chagas' Disease. *Clin Vaccine Immunol* 2009; 16 (5): 660-666.
18. Bryan MA, Guyach SE, Norris KA. Specific humoral immunity versus polyclonal B cell activation in *Trypanosoma cruzi* infection of susceptible and resistant mice. *PLoS Negl Trop Dis* 2010; 4 (7): e733.

19. Basso B. Modulation of immune response in experimental Chagas disease. *World journal of experimental medicine* 2013; 3 (1): 1-10.
20. De Souza SM y Cols. Dogs infected with the blood trypomastigote form of *Trypanosoma cruzi* display an increase expression of cytokines and chemokines plus an intense cardiac parasitism during acute infection. *Mol Immunol* 2014; 58 (1): 92-7.
21. DosReis GA, Lopes MF. The importance of apoptosis for immune regulation in Chagas disease. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 2009; 104 Suppl 1: 259-62.
22. D'Avila H y Cols. Host cell lipid bodies triggered by *Trypanosoma cruzi* infection and enhanced by the uptake of apoptotic cells are associated with prostaglandin E generation and increased parasite growth. *J Infect Dis* 2011; 204 (6): 951-61.
23. Prado CM, Jelicks LA, Weiss LM, Factor SM, Tanowitz HB, Rossi MA. The vasculature in chagas disease. *Adv Parasitol* 2011; 76: 83-99.
24. Lin CP y Cols. Endothelial progenitor cell dysfunction in cardiovascular diseases: role of reactive oxygen species and inflammation. *Biomed Res Int* 2013; 2013: 845037.
25. Strijdom H. Endothelial dysfunction: are we ready to heed the vasculature's early-warning signal? *Cardiovascular journal of Africa* 2012; 23 (4): 184-5.
26. Feletou M, Kohler R, Vanhoutte PM. Nitric oxide: orchestrator of endothelium-dependent responses. *Annals of medicine* 2012; 44 (7): 694-716.
27. Giles TD, Sander GE, Nossaman BD, Kadowitz PJ. Impaired vasodilation in the pathogenesis of hypertension: focus on nitric oxide, endothelial-derived hyperpolarizing factors, and prostaglandins. *Journal of clinical hypertension* 2012; 14 (4): 198-205.
28. Rassi A Jr, Rassi A, Marcondes de Rezende J. American trypanosomiasis (Chagas disease). *Infectious disease clinics of North America* 2012; 26 (2): 275-91.
29. Maya JD, Orellana M, Ferreira J, Kemmerling U, Lopez-Muñoz R, Morello A. Chagas disease: Present status of pathogenic mechanisms and chemotherapy. *Biol Res* 2010; 43 (3): 323-31.
30. Spite M, Serhan CN. Novel lipid mediators promote resolution of acute inflammation: impact of aspirin and statins. *Circulation research* 2010; 107 (10): 1170-84.
31. Sadowitz B, Maier KG, Gahtan V. Basic science review: Statin therapy--Part I: The pleiotropic effects of statins in cardiovascular disease. *Vascular and endovascular surgery* 2010; 44 (4): 241-51.
32. Ye Y, Lin Y, Perez-Polo JR, Uretsky BF, Ye Z, Tieu BC, Birnbaum Y. Phosphorylation of 5-lipoxygenase at ser523 by protein kinase A determines whether pioglitazone and atorvastatin induce proinflammatory leukotriene B4 or anti-inflammatory 15-epi-lipoxin a4 production. *J Immunol* 2008; 181 (5): 3515-23.
33. Sprague AH, Khalil RA. Inflammatory cytokines in vascular dysfunction and vascular disease. *Biochem Pharmacol* 2009; 78 (6): 539-52.
34. Langer HF, Chavakis T. Leukocyte-endothelial interactions in inflammation. *Journal of cellular and molecular medicine* 2009; 13 (7): 1211-20.
35. Canalli AA y Cols. Participation of Mac-1, LFA-1 and VLA-4 integrins in the in vitro adhesion of sickle cell disease neutrophils to endothelial layers, and reversal of adhesion by simvastatin. *Haematologica* 2011; 96 (4): 526-33.
36. Stach K y Cols. Simvastatin and atorvastatin attenuate VCAM-1 and uPAR expression on human endothelial cells and platelet surface expression of CD40 ligand. *Cardiol J* 2012; 19 (1): 20-8.
37. Dichtl W y Cols. HMG-CoA reductase inhibitors regulate inflammatory transcription factors in human endothelial and vascular smooth muscle cells. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2003; 23 (1): 58-63.
38. Stalker TJ, Lefler AM, Scalia R. A new HMG-CoA reductase inhibitor, rosuvastatin, exerts anti-inflammatory effects on the microvascular endothelium: the role of mevalonic acid. *Br J Pharmacol* 2001; 133 (3): 406-12.

39. Weitz-Schmidt G y Cols. Statins selectively inhibit leukocyte function antigen-1 by binding to a novel regulatory integrin site. *Nat Med* 2001; 7 (6): 687-92.
40. Melo L y Cols. Low doses of simvastatin therapy ameliorate cardiac inflammatory remodeling in *Trypanosoma cruzi*-infected dogs. *Am J Trop Med Hyg* 2011; 84 (2): 325-31.
41. Serhan CN. Lipoxins and aspirin-triggered 15-epi-lipoxins are the first lipid mediators of endogenous anti-inflammation and resolution. *Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids* 2005; 73 (3-4): 141-62.
42. Shimizu S, Ogawa T, Seno S, Kouzaki H, Shimizu T. Pro-resolution mediator lipoxin A4 and its receptor in upper airway inflammation. *The Annals of otology, rhinology, and laryngology* 2013; 122 (11): 683-9.
43. Jozsef L, Zouki C, Petasis NA, Serhan CN, Filep JG. Lipoxin A4 and aspirin-triggered 15-epi-lipoxin A4 inhibit peroxynitrite formation, NF-kappa B and AP-1 activation, and IL-8 gene expression in human leukocytes. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2002; 99 (20): 13266-71.
44. Wu SH, Liao PY, Dong L, Chen ZQ. Signal pathway involved in inhibition by lipoxin A(4) of production of interleukins induced in endothelial cells by lipopolysaccharide. *Inflamm Res* 2008; 57 (9): 430-7.
45. Chinthamani S, Odusanwo O, Mondal N, Nelson J, Neelamegham S, Baker OJ. Lipoxin A4 inhibits immune cell binding to salivary epithelium and vascular endothelium. *American journal of physiology. Cell physiology* 2012; 302 (7): C968-78.
46. Saijonmaa O, Nyman T, Hohenthal U, Fyhrquist F. Endothelin-1 is expressed and released by a human endothelial hybrid cell line (EA.hy 926). *Biochem Biophys Res Commun* 1991; 181 (2): 529-36.
47. Suggs J. E, Madden MC, Friedman M, Edgell CJ. Prostacyclin expression by a continuous human cell line derived from vascular endothelium. *Blood* 1986; 68 (4): 825-9.
48. Thornhill MH, Li J, Haskard DO. Leucocyte endothelial cell adhesion: a study comparing human umbilical vein endothelial cells and the endothelial cell line EA-hy-926. *Scand J Immunol* 1993; 38 (3): 279-86.
49. Molina-Berrios A y Cols. Protective role of acetylsalicylic acid in experimental *Trypanosoma cruzi* infection: evidence of a 15-epi-lipoxin A(4)-mediated effect. *PLoS Negl Trop Dis* 2013; 7 (4): e2173.
50. Taylor FC, Huffman M, Ebrahim S. Statin Therapy for Primary Prevention of Cardiovascular Disease. *Jama-J Am Med Assoc* 2013; 310 (22): 2451-2452.
51. Bu DX, Griffin G, Lichtman AH. Mechanisms for the anti-inflammatory effects of statins. *Curr Opin Lipidol* 2011; 22 (3): 165-170.
52. Prado CM y Cols. Early dystrophin disruption in the pathogenesis of experimental chronic Chagas cardiomyopathy. *Microbes Infect* 2012; 14 (1): 59-68.
53. Manduteanu I, Simionescu M. Inflammation in atherosclerosis: a cause or a result of vascular disorders? *J Cell Mol Med* 2012; 16 (9): 1978-90.
54. Steyers CM, Miller FJ. Endothelial dysfunction in chronic inflammatory diseases. *International Journal of Molecular Sciences* 2014; 15 (7): 11324-49.
55. Wanner A, Mendes ES. Airway endothelial dysfunction in asthma and chronic obstructive pulmonary disease: a challenge for future research. *Am J Resp Crit Care* 2010; 182 (11): 1344-51.
56. Girard M, Giraud S, Courtioux B, Jauberteau-Marchan MO, Bouteille B. Endothelial cell activation in the presence of African trypanosomes. *Mol Biochem Parasit* 2005; 139 (1): 41-49.
57. Haraldsen G, Kvale D, Lien B, Farstad IN, Brandtzaeg P. Cytokine-regulated expression of E-selectin, intercellular adhesion molecule-1 (ICAM-1), and vascular cell adhesion molecule-1 (VCAM-1) in human microvascular endothelial cells. *J Immunol* 1996; 156 (7): 2558-65.
58. Mita H, Yui Y, Shida T. Effect of AA-861, a 5-lipoxygenase inhibitor, on leukotriene synthesis in human polymorphonuclear leukocytes and on cyclooxygenase and 12-lipoxygenase activities in human platelets. *Allergy* 1986; 41 (7): 493-8.

59. Zarbock A. Selectin-mediated integrin activation and leukocyte recruitment. *J Vasc Res* 2011; 48: 29-29.
60. Golias C, Tsoutsi E, Matziridis A, Makridis P, Batistatou A, Charalabopoulos K. Leukocyte and endothelial cell adhesion molecules in inflammation focusing on inflammatory heart disease. *In Vivo* 2007; 21 (5): 757-769.
61. Schmidt S, Moser M, Sperandio M. The molecular basis of leukocyte recruitment and its deficiencies. *Mol Immunol* 2001; 55 (1): 49-58.
62. Hersberger M. Potential role of the lipoxygenase derived lipid mediators in atherosclerosis: leukotrienes, lipoxins and resolvins. *Clinical Chemistry and Laboratory Medicine : CCLM / FESCC* 2010; 48 (8): 1063-73.