



UNIVERSIDAD DE BELGRANO

Las tesis de Belgrano

Facultad de Ciencias Exactas y Naturales
Carrera Licenciatura en Ciencias Biológicas

Estudio de carga parasitaria y mediadores
inflamatorios en tejidos murinos infectados
con *Trypanosoma cruzi* y tratados con el ligando
natural de PPAR γ

N° 637

Sofía Siffo

Directora: Dra. Nora Beatriz Goren
Co-director: Dr. Federico Nicolás Penas

Departamento de Investigaciones
2014

Universidad de Belgrano
Zabala 1837 (C1426DQ6)
Ciudad Autónoma de Buenos Aires - Argentina
Tel.: 011-4788-5400 int. 2533
e-mail: invest@ub.edu.ar
url: <http://www.ub.edu.ar/investigaciones>

A Emi y Lau

«Que tes rêves ne s'envolent jamais»

Agradecimientos

A lo largo de estos años recibí el apoyo incondicional de distintas personas las cuales, de alguna manera, son partícipes de este pequeño logro. Quiero agradecer a quienes hicieron posible que hoy pueda obtener un título universitario.

En primer lugar quiero darle las gracias a mi mamá, quien es mi mayor guía y luz en este camino de vida. En segundo lugar a mis hermanos, Nico y Flor, sin los cuales no hubiera conocido la risa. Siempre estuvieron conmigo: "The force be with you". Agradecer a mi abuela, cuya fortaleza me inspira cada día. Nada sería posible sin ustedes 4.

Quiero también agradecer a mi papá, quien nunca dudó en que este día llegaría.

Muchas gracias a la Dra. Nora Goren por abrirme las puertas de su laboratorio y depositar en mi tanta confianza. Gracias por la comprensión y, sobre todo, por la ayuda y el empujón en este último tiempo. Gracias de corazón al Dr. Federico Penas, quien con mucha paciencia me enseñó, alentó y acompañó a lo largo de este trabajo.

Quiero agradecer al Dr. Gerardo Mirkin por inculcarme lo más importante: el amor a lo que uno hace. También a Ágata, quien me contuvo durante el último tramo y me brindó todo su apoyo sin dudar.

A Maribel por el excelente trabajo técnico en el preparado de todo el material y por tan buena predisposición. A Ricardo y Eduardo por su gran ayuda con las infecciones y las parasitemias de los ratones. A Sabri, Vero y Vale por facilitarme la tarea en el manejo de animales y por su dedicación. ¡Muchas gracias!

Quiero darle las gracias a Víctor y su familia, quienes me acompañaron siempre con mucho cariño.

Un agradecimiento especial a mis amigas. Marian, única e irremplazable. Melo, con quien he compartido gran parte de mi vida. Mis queridas Fer y Quilla, una gran hermana y una ahijada que amo. Agus, gracias por tanto amiga. Para ustedes las palabras de agradecimiento nunca van a ser suficientes.

Quiero agradecer a mi maestro, Daniel, por abrirme las puertas del Dojo y enseñarme a pararme firme ante la vida, pero flexible ante el viento. Gracias también a su shinai por enderezarme cuando más lo necesitaba, y a todos los compañeros de Seiken, en particular a Ariel por su amistad y a Rafael por su entrega gigante.

Un agradecimiento a quien este último tiempo me demostró que somos lo que somos, hasta que el amor nos encuentra. Gracias Mati...

Gracias a todos mis compañeros de la facu, entre ellos Milky, Gigi, Andy, CC+, Marian, Vicky. En especial quiero agradecer a Sugus y Eric que, de no ser por su paciencia inagotable, quizás no estaría acá. Gracias totales!

Desde ya muchas gracias a los compañeros del piso 11 y 13 que nos prestaron sus instalaciones, y sobre todo a los chicos del piso 12 por la compañía y la risas diarias: Gera, Silvi, Maxi, Andre, Cami, Cin, Coty, Seba, Charo, Angie, Eli, en fin, ¡A todos!

Por último agradezco al Dto. de Microbiología, Parasitología e Inmunología de la Facultad de Medicina de la Universidad de Buenos Aires y al Instituto de Microbiología y Parasitología Médicas (IMPAM) por haber sido el lugar en el que desarrollé mis trabajo de tesina. Además, a los subsidios otorgados por la UBA, la Agencia Nacional de Ciencia y Tecnología, el CONICET y la Fundación Roemmers que permitieron la realización de este trabajo.

Abreviaturas

ADN:	Ácido deoxiribonucleico
ARN:	Ácido ribonucleico
ARNm:	ARN mensajero
ASA:	Sulfanilamida
Benznidazol:	2-nitroimidazol N-bencil-2-(2-nitroimidazol-1-il) acetamida
BSA:	Albúmina sérica bovina
°C:	Grado centígrado
Ca⁺⁺:	Calcio
CaM:	Calmodulina
Ct	Ciclo umbral
DNAsa:	Deoxiribonucleasa
dNTP:	Deoxinucleótido trifosfato
dpi:	Días post infección
dT:	Deoxitimina
DTT:	Ditiotreitol
EDTA:	Ácido etilendiaminotetraacético
EGTA:	Ácido bis(2-aminoetil) etilenglicol-tetraacético
ERK:	Quinasa regulada por señales extracelulares
FITC:	Isotiocianato de fluoresceína
FNa:	Fluoruro de sodio
h:	Horas
H₂O₂:	Peróxido de hidrógeno
HCl:	Ácido clorhídrico
HCIO:	Ácido hipocloroso
HEPES:	4-(2-hidroxietil)-1 ácido piperazinetanosulfónico
HRP:	Peroxidasa de rábano
ip:	Intraperitoneal
IL:	Interleuquina
INF-γ:	Interferon gamma
KCl:	Cloruro de potasio
kDa:	Kilodalton
Kg:	Kilogramo
KHCO₃:	Carbonato ácido de potasio
KO:	Knock out
LPS:	Lipopolisacárido
mA:	Miliamperio
MAPK:	Proteín quinasa activada por mitógeno
MCC:	Miocardopatía chagásica crónica
MEC:	Matriz extracelular
mg:	Miligramo
min:	Minuto
mL:	Mililitro
MML-V:	Virus Murino de Leucemia Moloney
MMP:	Metaloproteasa de la matriz
NaCl:	Cloruro de sodio
NaVO₄:	Ortovanadato de sodio
NF-κB:	Factor nuclear κ B
NH₂:	Amino
NH₄Cl:	Cloruro de amonio
Nifurtimox:	N-(3-metil-1,1-dioxo-1,4-tiazinan-4-il)-1-(5-nitro-2-furil) metanimina
NIH:	Instituto de Salud de los Estados Unidos
nm:	Nanómetro
nM:	Nanomolar
NO:	Óxido nítrico
NO₂⁻:	Nitritos
NO₃⁻:	Nitratos

NOS2:	Óxido nítrico sintasa inducible
O₂⁻:	Anión superóxido
OGP:	Octil-beta-glucopiranosido
OMS:	Organización Mundial de la Salud
OPS:	Organización Panamericana de la Salud
PAF:	Factor activador de plaqueta
PAGE:	Electroforesis en gel de poliacrilamida
PBS:	Buffer fosfato salino
PCR:	Reacción en cadena de la polimerasa
PGD2:	Prostaglandina D2
pM:	Picomolar
PMN:	Polimorfonucleares
PMSF:	Fenil metil sulfonil fluoruro
PPAR:	Receptores activados por factores de proliferación peroxisomal
PVDF:	Polifluoruro de vinilideno
Q-RT-PCR:	RT-PCR cuantitativa y a tiempo real
rpm.:	Revoluciones por minuto
RNAse:	Ribonucleasa
RNS:	Especie reactiva del nitrógeno
RONS:	Especies reactivas del oxígeno y nitrógeno
ROS:	Especies reactiva de oxígeno
RPMI:	Medio roswell park memorial institute
RT:	Retrotranscripción
RXR:	Receptor del ácido retinoico
Seg:	Segundo
DE:	Desvío estándar
SDS:	Duodecil sulfato de sodio
SFB:	Suero fetal bovino
<i>T. cruzi</i>:	<i>Trypanosoma cruzi</i>
TNF-α:	Factor de necrosis tumoral alpha
Tris:	Tris-(hidroximetil)-aminometano
TZD:	Tiazolidinediona
Wb:	Western blot
μg:	Microgramo
μM:	Micromolar
15dPGJ2:	15-deoxi- Δ 12,14-prostaglandina J2

Índice

INTRODUCCIÓN	9
<i>Enfermedad de Chagas. Características generales</i>	9
Agente etiológico.....	10
Ciclo de vida de <i>T. cruzi</i>	11
Fases de la enfermedad de Chagas.....	11
Fase Aguda.....	11
Fase crónica.....	12
Tratamiento.....	12
<i>Respuesta inflamatoria y T. cruzi</i>	13
Mediadores inflamatorios.....	14
Citoquinas.....	14
Clasificación.....	14
Citoquinas proinflamatorias: IL-1 β , TNF- α e IL-6.....	14
Especies reactivas: Óxido nítrico.....	15
<i>Resolución de la inflamación</i>	16
Receptores activados por factores de proliferación peroxisomal: PPAR.....	16
PPAR γ y la modulación de la respuesta inflamatoria.....	16
15-deoxi- $\Delta^{12,14}$ -PGJ2 (15dPGJ2): Ligando natural de PPAR γ	17
OBJETIVOS	18
Objetivo general.....	18
Objetivos específicos.....	18
MATERIALES Y MÉTODOS	18
<i>Reactivos</i>	18
<i>Modelo in vivo</i>	18
Ratones.....	18
Parásitos.....	19
Drogas y tratamiento.....	19
<i>Determinación del parasitismo</i>	19
Parasitemia.....	19
Parasitismo tisular.....	19
Carga parasitaria.....	20
Extracción de ADN.....	20
Cuantificación del ADN.....	20
Preparación del ADN y PCR cuantitativa a tiempo real (Q-RT-PCR).....	20
<i>Sobrevida</i>	20
<i>Medición de parámetros inflamatorios</i>	21
Extracción de ARN total.....	21
RT PCR cuantitativa y a tiempo real (Q-RT-PCR).....	21
Preparación de extractos proteicos.....	21
Cuantificación de proteínas.....	22
Análisis de proteínas mediante Western blot (Wb).....	22
<i>Análisis estadísticos</i>	22
RESULTADOS	23
<i>Caracterización del modelo in vivo de infección aguda con cepa letal (RA) de Trypanosoma cruzi</i>	23
Parasitismo.....	23
Carga parasitaria.....	24
Curva estándar de TCZ.....	24
Cuantificación de carga parasitaria.....	27
Expresión de mediadores inflamatorios.....	28
Expresión y activación de NOS2.....	28
Expresión de citoquinas pro inflamatorias.....	29

<i>Papel de 15dPGJ2 en los diferentes tejidos en la etapa aguda de la infección con T. cruzi</i>	31
Papel de 15dPGJ2 sobre la parasitemia y carga parasitaria	31
Papel de 15dPGJ2 sobre mediadores inflamatorios	32
DISCUSIÓN	35
CONCLUSIONES	37
BIBLIOGRAFÍA	38

INTRODUCCIÓN

1. Enfermedad de Chagas. Características generales

La enfermedad de Chagas o tripanosomosis americana es una enfermedad infecciosa, sistémica y crónica causada por la infección con el protozoo unicelular *Trypanosoma cruzi* (*T. cruzi*). Esta patología es una zoonosis compleja transmitida por varias especies de triatomíneos hematófagos y sostenida por más de setenta géneros de mamíferos que actúan como reservorio, entre los cuales se encuentra el ser humano. La existencia de este parásito fue descrita en 1909 por el médico brasileño Carlos Chagas.

Años más tarde, el médico argentino Salvador Mazza redescubrió la enfermedad, al realizar los primeros diagnósticos de tripanosomosis americana en Argentina entre los años 1934 y 1943 (Mazza S., 1934; Mazza S. y col., 1936; Mazza S., 1943).

La infección con este parásito puede permanecer por muchos años de forma asintomática, pero alrededor de un 30% de los individuos infectados desarrollan en la etapa crónica de la enfermedad severos mega-síndromes cardíacos, digestivos, o ambos (Tanowitz HB. y col., 2009). Entre estos síntomas, la insuficiencia cardíaca congestiva, consecuencia de la miocardiopatía dilatada, constituye la más seria y frecuente manifestación clínica en pacientes con infección crónica por *T. cruzi* (Ribeiro AL. y col., 2012). Este fenómeno se asocia a la persistencia parasitaria que va acompañada de un intenso infiltrado inflamatorio que, secundariamente, desemboca en remodelación cardíaca con agrandamiento de las cámaras cardíacas, adelgazamiento parietal y fibrosis intersticial.

La infección por *T. cruzi* es endémica en una gran extensión del continente americano, que comprende desde el sur de Estados Unidos hasta la Argentina y Chile (Reisenman CE. y col., 2010).

Se estima que existen entre 8 y 15 millones de casos de infección por *T. cruzi*, y que cada año hay aproximadamente entre 50.000 y 200.000 casos nuevos, evidenciando que la prevención y el control son limitados. Sumado a esto, el diagnóstico y las opciones terapéuticas no son del todo satisfactorias, dando lugar a que aproximadamente 20.000 personas con enfermedad de Chagas mueran cada año por problemas cardíacos en zonas endémicas (Tanowitz HB. y col., 2009; Rassi A. Jr. y col., 2010; Tarleton RL. y col., 2007).

1.1. Agente etiológico

T. cruzi, agente etiológico de la enfermedad de Chagas, es un parásito intracelular que se ubica taxonómicamente dentro del reino Protista, familia Trypanosomatidae, género *Trypanosoma*, especie *Trypanosoma cruzi*. (Fig. 1). Es transmitido por al menos 40 especies diferentes de triatomíneos a más de 1.000 especies de mamíferos incluyendo el ser humano, (Brenner Z. y col., 2000; Rassi A. Jr. y col., 2010).

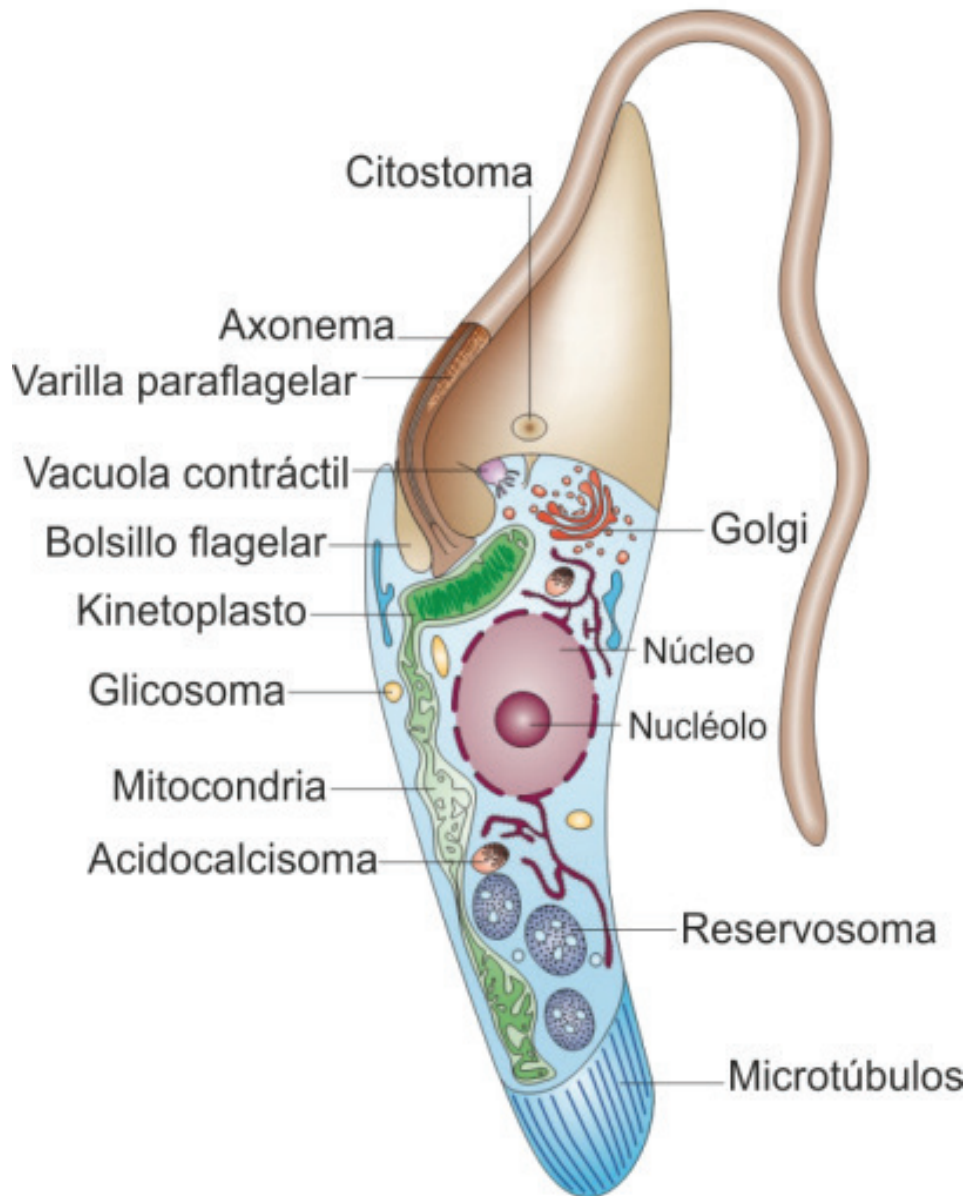


Figura 1. Representación esquemática de *T. cruzi*. Las principales formas celulares de los tripanosomátidos están dadas por la presencia del flagelo y la posición del kinetoplasto con respecto al núcleo. Este esquema representa el estadio epimastigote. (Adaptado de Docampo R. y col., 2005).

1.2. Ciclo de vida de *T. cruzi*

Una característica específica de los tripanosomátidos es que cambian de estadio durante su ciclo de vida. Estos cambios son producto de procesos adaptativos en función a la gran diversidad de ambientes a lo que se exponen.

Los vectores que transmiten la enfermedad al ser humano pertenecen a la Familia Reduviidae, subfamilia Triatominae. Dentro de los más importantes en la transmisión de *T. cruzi* se encuentra *Triatoma infestans*, popularmente llamada chinche gaucha o vinchuca.

En el siguiente esquema se resume el ciclo de vida del parásito:

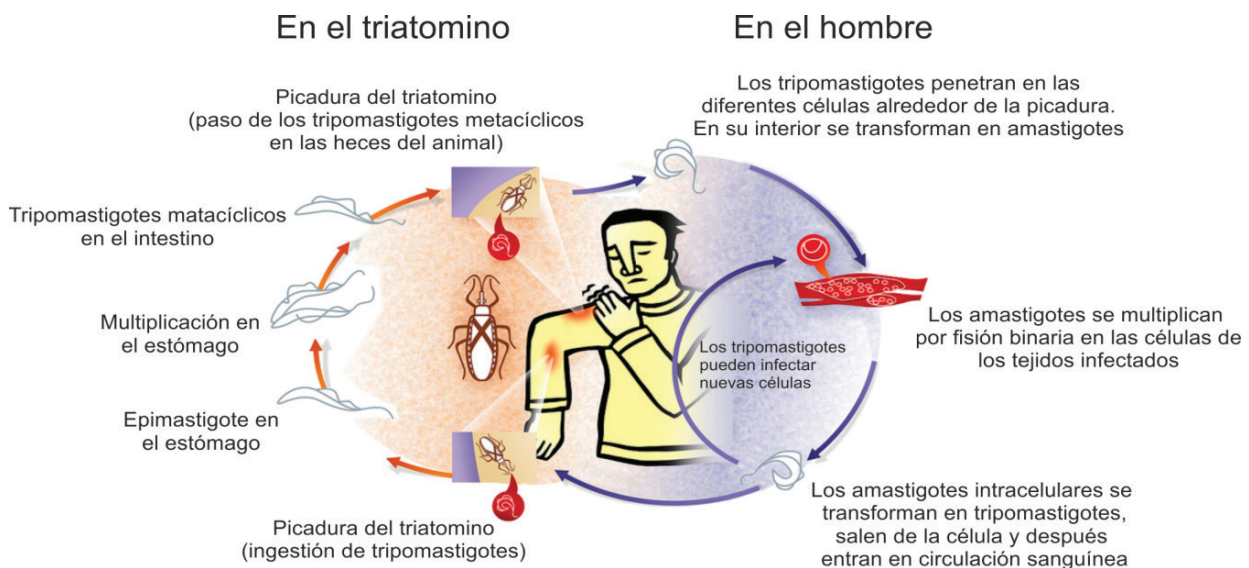


Figura 2. Representación esquemática del ciclo de vida de *T. cruzi*

1.3. Fases de la enfermedad de Chagas

1.3.1. Fase Aguda

La fase aguda de esta enfermedad dura de 4 a 8 semanas, durante las cuales ocurren repetidos ciclos asincrónicos de multiplicación del parásito, destrucción de células hospedadoras e invasión de nuevas células (Bern C. y col., 2011). El diagnóstico en esta etapa es primariamente parasitológico, donde pueden observarse tripomastigotes móviles en preparaciones frescas de sangre, pudiendo ser los análisis serológicos negativos (Tanowitz HB. y col., 2009; Rassi A. Jr. y col., 2010).

Esta fase puede cursar con sintomatología leve como fiebre o malestar, o más grave con resfrío, náuseas, vómitos, diarrea, erupciones, e irritación meníngea o puede ocurrir que sea asintomática. En fase aguda severa se presenta miocarditis, meningoencefalitis, esplenomegalia y agrandamiento de nódulos linfáticos, llegando a una tasa estimada de casos fatales del 0,25% al 0,50%, debida a las fallas cardíacas arritmias y bloqueo cardíaco (Bern C. y col., 2011). El chagoma es uno de los signos más característicos. Se presenta como una lesión inflamatoria que consiste en una zona de endurecimiento cutáneo en el sitio de entrada del parásito, que tiene un color rojo con alta temperatura local y tiende a desaparecer al cabo de 2 o 3 meses. Otra manifestación propia es el signo de Romaña, un edema periorbital unilateral que toma color morado con conjuntivas rojas que junto a la conjuntivitis, linfadenopatía y hepato-esplenomegalia han sido descriptos en pacientes en fase aguda (Tanowitz HB. y col., 2009).

Las manifestaciones de esta etapa se resuelven espontáneamente en el 90% de las personas infectadas incluso en personas no tratadas con drogas tripanocidas. Sin embargo, aunque los parásitos ya no son detectables en sangre, no son completamente eliminados, e infectan células de varios tejidos específicos persistiendo indefinidamente durante la vida del hospedador (Rassi A. Jr. y col., 2012). Luego, los pacientes entran a la etapa indeterminada, actualmente eliminada de clasificación de las fases de la enfermedad. La misma se caracteriza por presentar serología positiva y ausencia de manifestaciones clínicas atribuibles a la infección (Tanowitz HB. y col., 2009; Bern C. y col., 2011).

1.3.2. Fase crónica

Una vez transcurrida la fase aguda, la respuesta inmune del hospedero logra controlar la parasitemia dando comienzo a la siguiente fase de la infección. Habitualmente, esta etapa es asintomática y se extiende durante toda la vida del paciente. Desde el punto de vista epidemiológico estos pacientes constituyen un reservorio importante de la infección. Por razones que aún se desconocen, aproximadamente 30% de los individuos puede presentar manifestaciones clínicas luego de un período comprendido entre 10 a 20 años. Cuando estas manifestaciones aparecen, los pacientes pueden presentar compromiso de diferentes órganos, por lo cual los síntomas y/o signos clínicos que se observan son de expresión variada. Sin embargo, las formas cardíacas y digestivas son las de mayor relevancia epidemiológica (Prata A., 2001).

Los primeros síntomas de la afección cardíaca comprenden anomalías en el sistema de conducción, particularmente por bloqueo completo de la rama derecha o hemibloqueo de la rama anterior izquierda del haz de His (Rassi A. Jr. y col., 2012). A medida que la enfermedad progresa, los pacientes desarrollan arritmias auriculares y ventriculares, disfunción ventricular izquierda, eventos tromboembólicos, miocardiopatía dilatada e insuficiencia cardíaca congestiva. Estos cambios son de carácter irreversible y conducen a las personas infectadas a una situación invalidante con alteraciones estructurales y funcionales del miocardio que pueden conducir a la muerte (Machado FS. y col., 2012).

Las alteraciones descriptas tanto para la fase aguda como para la crónica suelen ser diversas y dependen tanto del contexto genético del huésped, de la edad, su estado inmunológico y nutricional, así como de las características biológicas del parásito (cepa, virulencia, inóculo). Hasta hace poco tiempo se consideraba que esta forma de la enfermedad era producto de una reacción autoinmune producida por los auto-anticuerpos generados en la infección con *T. cruzi*. (Goin JC. y col., 1994; Borda ES. y col., 1996). Recientemente se ha confirmado la persistencia del parásito en el desarrollo y progresión de la miocardiopatía chagásica (Rassi A. Jr. y col., 2010).

1.4. Tratamiento

A pesar del tiempo transcurrido desde el descubrimiento de la enfermedad de Chagas, aún no se dispone de una quimioterapia totalmente eficaz para el tratamiento de la misma. Las drogas más utilizadas en la actualidad son nitrofuranos: (RS)-N-(3-metil-1,1-dioxo-1,4-tiazinan-4-il)-1-(5-nitro-2-furil) metanimina (Nifurtimox, Lampit® Bayer), sintetizado en 1952, y el derivado de 2-nitroimidazol N-bencil-2-(2-nitroimidazol-1-il) acetamida (Benznidazol), sintetizado en 1968. Estos compuestos ejercen su actividad biológica a través de la formación de radicales libres y/o metabolitos electrolíticos (derivados nitrosos e hidroxilamina) o por inhibición directa de las enzimas involucradas en la detoxificación del parásito (Maya J. col., 2010). Sin embargo, el tratamiento no siempre es efectivo, observándose casos de resistencia (Mejía AM. y col., 2012; Alsford S. y col., 2013) y, además, presentan alta toxicidad sistémica, siendo los efectos adversos causa frecuente de suspensión de la terapia (Castro JA. y col., 2006; Viotti R. y col., 2009).

En la actualidad no existen fármacos que superen la acción parasiticida del Nifurtimox o Benznidazol. Numerosos compuestos químicos naturales o sintéticos con potencial actividad tripanosida están en fase de experimentación, incluyendo al alopurinol, ketoconazol e itraconazol, quinonas, antioxidantes y otros fármacos de uso clínico, tales como fenotiazinas (Apt W. y col., 2005; Maya JD. y col., 2007; Urbina JA., 2009). Sin embargo, por diversas razones (insensibilidad o resistencia, insolubilidad, toxicidad o eficacia clínica baja) la mayoría de los compuestos estudiados no han demostrado ser mejores que los antiparasitarios utilizados en la actualidad (Maya JD. y col., 2010). El tratamiento antiparasitario está indicado para todos los casos de enfermedad aguda, congénita y reactivada. La decisión de tratar a los pacientes

con Chagas crónico todavía sigue siendo algo controvertido (Reyes PA. y col., 2005). Los resultados de los ensayos con Benznidazol en pacientes adultos con enfermedad de Chagas crónica, basados en indicadores serológicos y parasitológicos (ensayos TRAENA), sugieren que dicho tratamiento induciría a una menor progresión clínica de la enfermedad (Riarte A. y col., 2013).

En todos los casos anteriormente descritos se indica acompañamiento médico y pruebas de laboratorio clínico a fin de monitorear al paciente ya que el tratamiento presenta efectos colaterales como anorexia, pérdida de peso y manifestaciones digestivas como náuseas, vómitos y ocasionalmente cólicos intestinales y diarrea. También son frecuentes los efectos dermatológicos, como erupción cutánea maculopapular y dermatitis alérgica. Las complicaciones más graves son agranulocitosis, fiebre y septicemia. Estas manifestaciones de intolerancia o hipersensibilidad podrían evitarse con la reducción de la dosis o suspensión del fármaco.

Las drogas tripanocidas actuales seguirán siendo por el momento las de elección ya que el mercado que representan los pacientes chagásicos no motiva la investigación y desarrollo de nuevas drogas por parte del sector privado o las autoridades nacionales y organismos como la OPS y OMS no han definido aún estrategias concertadas para enfrentar este problema (Médicos sin fronteras, 2003).

2. Respuesta inflamatoria y *T. cruzi*

Existe consenso de que la infección por *T. cruzi* induce en el sistema inmune del hospedero complejos procesos inflamatorios a nivel de los tejidos para garantizar el control del crecimiento del parásito. La respuesta inmune que se desata es crucial para otorgar protección contra esta enfermedad. Sin embargo, los desequilibrios inmunológicos pueden conducir a lesiones en tejido cardíaco, tracto digestivo o a nivel sistémico en los pacientes que padecen la enfermedad de Chagas.

La intensa respuesta inflamatoria que se desata durante la etapa aguda de la enfermedad y que se extiende hasta los primeros períodos de la fase crónica, es la que determinaría cómo se manifestarán los diferentes síntomas que se observan durante la infección crónica. Después de la invasión, los tripomastigotes de *T. cruzi* infectan a una variedad de tipos celulares incluyendo, macrófagos, células musculares, miocardiocitos, neuronas, fibroblastos, etc. Entre estas células, los macrófagos infectados y los miocardiocitos son unos de los principales productores de citoquinas pro inflamatorias, como factor de necrosis tumoral (TNF- α), interleuquina 6 (IL-6) e interleuquina 1 beta (IL-1 β) (Tarleton RL., 1988; Hovsepian E. y col., 2011) y de enzimas pro inflamatorias, entre ellas la óxido nítrico (NO) sintasa inducible (iNOS o NOS2), cuyo metabolito, el NO, es de gran importancia para la eliminación de los parásitos y para proporcionar las señales inflamatorias necesarias de la respuesta inmune adaptativa (Teixeira M. y col., 2002). Sin embargo, la producción en exceso de estos mediadores inflamatorios puede producir importantes daños en diversos tejidos (Gutierrez F. y col., 2009).

Las lesiones provocadas en la fase aguda de la enfermedad se caracterizan por la presencia de reacciones inflamatorias localizadas, con un predominio de células mononucleares en diferentes focos o con la formación de granulomas localizados principalmente en músculo esquelético y tejido cardíaco (Coura JR. y col., 2010).

Durante la fase crónica asintomática, se evidencia que la respuesta inflamatoria persiste, aunque presenta características inmunomoduladoras. Las bases moleculares de esta supuesta modulación inflamatoria aún no han sido del todo esclarecidas. Se han propuesto diversos mecanismos, como la producción escasa de IFN- γ y TNF- α (Ferreira RC. y col., 2003; Talvani A. y col., 2004) y la alta producción de IL-10 ejercida por monocitos (Souza PE. y col., 2004). Estas citoquinas se encuentran en niveles más elevados en pacientes con miocardiopatía chagásica crónica (MCC) que en pacientes crónicos asintomáticos, este hecho, entre otros, podría contribuir al desarrollo de la severa miocardiopatía encontrada en esta patología (Correa-Oliveira R. y col., 1999; Gomes J. y col., 2003; Souza P. y col., 2004). La pérdida progresiva de los miocardiocitos en la MCC, ya sea por efecto directo del parásito o del proceso inflamatorio induciría fibrosis cardíaca, como mecanismo de sustitución del tejido necrótico. Hay deposición progresiva de fibronectina, laminina y colágeno tipo III y IV en las zonas de infiltración de células inflamatorias, que se expanden y distorsionan la matriz extracelular (MEC), pudiendo interferir con la función contráctil del corazón (Machado FS. y col., 2012). Por otro lado, los macrófagos activados como consecuencia de la infección liberan citoquinas y proteasas que amplificarían esta degradación. Todos estos fenómenos producirían

la destrucción focal progresiva de los componentes de la MEC durante todo el curso de la enfermedad, particularmente en el ápice del ventrículo izquierdo, favoreciendo la formación del aneurisma de punta que caracteriza la MCC (Tanowitz HB. y col., 2009).

2.1. Mediadores inflamatorios

Ante la presencia de un patógeno, las células del sistema inmune disparan la producción de sustancias químicas que mediarán el desarrollo del proceso inflamatorio. Aunque la gran mayoría de estas sustancias son producto de células inflamatorias y de sistemas enzimáticos del plasma que participan en la respuesta inflamatoria, algunas también pueden ser liberadas por otros tejidos. Estos mediadores inflamatorios modulan una variedad de eventos inmunológicos y metabólicos y pueden tener efectos autócrinos, parácrinos o endócrinos. Se pueden clasificar principalmente en: a) Aminas vasoactivas: histamina y serotonina, b) Proteasas plasmáticas: Sistema de quininas, del complemento y de la coagulación, c) Mediadores lipídicos: leucotrienos, prostaglandinas y factor activador de plaquetas (PAF) d) Citoquinas y quimioquinas: IL-1, TNF- α , IL-6 e IL-8, y e) Especies reactivas de oxígeno (ROS) y nitrógeno (RNS): H₂O₂, O₂⁻ y NO.

2.1.1. Citoquinas

Las citoquinas, entre los diferentes mediadores inflamatorios, cumplen un papel fundamental ya que median la inducción y modulación de la respuesta inflamatoria con el fin de resolver el proceso infeccioso. Son polipéptidos producidos por diversos tipos celulares que ejercen sus efectos a través de la interacción con receptores de membrana específicos, induciendo diversas vías de señalización intracelular (por ejemplo, a través de ERK/MAPK y NF- κ B). La producción de estas moléculas está generalmente autolimitada y aunque en general poseen una vida media corta, algunas de ellas pueden persistir en circulación durante largos periodos de tiempo. Los efectos ejercidos por las citoquinas son altamente pleiotrópicos y redundantes y poseen la capacidad de inducir la síntesis y liberación de nuevos mediadores inflamatorios por células endoteliales, macrófagos y linfocitos activados.

Clasificación

A través de experimentos *in vitro* con clones de linfocitos T de ratón, las citoquinas más importantes implicadas en la inflamación se han clasificado clásicamente como Th1 y Th2 (Mosmann T. y col., 2009). Entre las citoquinas de tipo Th1 se encuentran IL-2, IFN- γ , IL-6, TNF- α e IL-1 β que inducen tanto una respuesta mediada por células, como una respuesta humoral. En cambio, las células Th2 producen IL-10 e IL-4, que colaboran a la respuesta inmune humoral y poseen propiedades antiinflamatorias. El fenotipo de secreción de las citoquinas depende, entre otros factores, del estado de diferenciación de las células, del microambiente en el que se encuentran, como del agente infeccioso que esté involucrado (Mosmann T. y col., 2009).

Citoquinas proinflamatorias: IL-1 β , TNF- α e IL-6

IL-1 β , TNF- α e IL-6 participan en la inducción de la respuesta inflamatoria aguda, local y sistémica con el fin de eliminar el agente causal del proceso infeccioso. A tal fin, actúan sobre las diferentes poblaciones celulares cercanas al foco inflamatorio, que en conjunto culminan en el reclutamiento de leucocitos al sitio de infección.

IL-1 β y TNF- α incrementan el reclutamiento y maduración de macrófagos y polimorfosnucleares (PMNs). Entre los efectos parácrinos que poseen estas citoquinas se encuentra el incremento de la permeabilidad y proliferación vascular y la síntesis de colágeno en el tejido cardíaco. Además, estimulan la producción de proteínas de fase aguda como proteína C-reactiva, α -1-antitripsina, ceruloplasmina, haptoglobina, fibrinógeno, proteína amiloide sérica, etc. por los hepatocitos y actúan sobre el hipotálamo induciendo fiebre.

IL-6 posee propiedades fisiológicas similares a las de TNF- α pero con menor capacidad para producir shock. Esta citoquina está vinculada a fenómenos hematológicos y metabólicos agudos que se asocian con la sepsis (Lippitz B., 2013).

TNF- α es una de las citoquinas más estudiadas en la fisiopatología cardíaca ya que posee efectos directos sobre la contractilidad de los miocardiocitos y se ha demostrado que altera la homeostasis del calcio (Ca^{++}) (Janczewski A. y col., 2010).

Entre los efectos negativos de TNF- α se encuentran el colapso circulatorio y el daño de órganos sólidos. Esta citoquina posee propiedades procoagulantes que favorecen los fenómenos trombóticos de la microcirculación que pueden llevar a la necrosis celular y a un aumento de la permeabilidad. Además, contribuye a producir una depresión miocárdica y acúmulo de macrófagos y PMNs activados en los lugares de inflamación o lesión (Waters JP. y col., 2013). Al igual que TNF- α , IL-6 también es producida en el miocardio y ambas participan como mediadores de procesos proinflamatorios provocando daño al tejido y conduciendo al fallo cardíaco. Ambas contribuyen al desarrollo y progresión de la insuficiencia cardíaca ya que promueven la hipertrofia de miocardiocitos, activan las metaloproteasas de la matriz (MMPs), provocan disfunción contráctil e inducen apoptosis (Engel D. y col., 2004; Gwechenberger M. y col., 2004; Yndestad A. y col., 2007).

Por otra parte, las células no inmunes responden a la infección por *T. cruzi* produciendo citoquinas y mediadores inflamatorios. Por ejemplo, la infección de células gliales entéricas con *T. cruzi* provoca la inducción directa de IL-1 β e IL-6 (da Silveira AB. y col., 2007). Además, se observa una alta producción de citoquinas proinflamatorias en células endoteliales infectadas con *T. cruzi* (Pinto AM. y col., 2011). Estudios en miocardiocitos aislados de ratones infectados indican que estas células responden a la infección produciendo citoquinas y mediadores proinflamatorios (Ba X. y col., 2010; Hovsepian E. y col., 2011). En conjunto, estos resultados resaltan la importancia de las dos respuestas, inflamatoria y antiinflamatoria, durante la infección por *T. cruzi*, e indican que el balance entre las citoquinas Th1 y Th2 es determinante para el desarrollo favorable de esta patología (Machado FS. y col., 2012).

2.1.2. Especies reactivas: Óxido nítrico

Durante la inflamación, la acción combinada de hormonas, citoquinas y segundos mensajeros, denominados señales de “arranque” conducen al reclutamiento de mastocitos y leucocitos. Estas células, tras un fuerte aumento del consumo de oxígeno, “estallido respiratorio”, dan paso a una masiva liberación de ROS y RNS, colectivamente denominadas RONS, incluyendo NO, O_2^- , H_2O_2 y ácido hipocloroso (HClO), a niveles muy por encima del umbral tóxico.

El NO es un radical libre gaseoso que tiene una vida media corta, entre 6 y 10 segundos y un alto potencial de difusión. Bajo condiciones normales, reacciona con oxígeno y es convertido a nitritos (NO_2^-) y nitratos (NO_3^-). Bajo condiciones fisiológicas, el NO (concentraciones en los rangos pM o nM) actúa como segundo mensajero en el sistema nervioso central, inhibe la adhesión y agregación plaquetaria y confiere citoprotección. Sin embargo, a altas dosis el NO puede interactuar con otras especies para generar RONS, cuyos efectos pueden ser deletéreos para las células debido a su alta capacidad oxidativa.

Existen tres isoformas de NO sintasas (NOS), NO sintasa neuronal (nNOS, NOS1), NOS inducible (iNOS, NOS2), y la NOS endotelial (eNOS, NOS3), todas ellas producen NO por conversión de L-arginina a L-citrullina. NOS1 y NOS3 se expresan constitutivamente y sintetizan bajas concentraciones de NO en respuesta a cambios en los niveles de Ca^{++} y calmodulina (CaM).

En particular, la isoforma NOS2 o iNOS es una enzima de 130 kDa activa en su forma dimérica y, a diferencia de las otras isoformas, se caracteriza por estar regulada a nivel transcripcional y por ser insensible a Ca^{++} /CaM (Pautz A. y col., 2010). Esta enzima, en contraste con las otras dos isoenzimas, puede producir continuamente altas cantidades de NO en respuesta a diversas citoquinas (TNF- α , IL-1 β , IFN- γ) u otros estímulos tales como la presencia de LPS (Pautz A. y col., 2010). Dentro de los diferentes tipos celulares que expresan NOS2 se encuentran hepatocitos, células endoteliales, monocitos, miocardiocitos, células mastoideas y células musculares lisas (Kleinert H. y col., 2004).

La participación multifacética del NO en la fisiología cardíaca está modulada por una estricta regulación molecular de las tres isoformas de NOS. Cada una posee un determinado confinamiento espacial celular y son susceptibles a modulación alostérica postraduccional.

3. Resolución de la inflamación

3.1. Receptores activados por factores de proliferación peroxisomal: PPAR

Los PPAR son receptores nucleares pertenecientes a la superfamilia de receptores de hormonas esteroideas de tipo 1. Son conocidos como sensores biológicos del metabolismo de lípidos, en particular de los niveles intracelulares de ácidos grasos. Además de estas funciones, estos receptores están involucrados en otros procesos biológicos importantes tales como, crecimiento, desarrollo, apoptosis y resolución de la inflamación en una amplia variedad de células (Pazienza V. y col., 2012).

Cuando fueron descubiertos a mediados del año 1990, a través de la clonación de un receptor murino, se observó que estos receptores se activaban por compuestos xenobióticos que causaban la proliferación de peroxisomas hepáticos en roedores, de ahí el nombre PPAR (Issemann I. y col., 1990).

Las diversas funciones de los PPAR son mediadas por tres subtipos diferentes de este receptor, codificados por distintos genes (PPAR α -NR1C1, PPAR β/δ -NR1C3 y PPAR γ -NR1C2). Estos subtipos se expresan en diferentes tejidos y en diferentes etapas de desarrollo de la célula, pudiendo presentar ligandos, genes blanco y papeles biológicos distintos (Escher P., y col., 2000). Esta multiplicidad de subtipos es un importante factor que contribuye tanto a la diversificación, como a la especificidad de señales. Por lo tanto, la activación de los PPAR es altamente dependiente del tipo celular (Nielsen R. y col., 2006).

En particular PPAR γ es un modulador del metabolismo de ácidos grasos y lípidos. Posee importantes funciones antiinflamatorias en macrófagos y en diversos tejidos, como el cardíaco. Este subtipo de receptor nuclear contribuye a la sensibilización a la insulina, en parte, a través de la regulación de adiponectina (Harmon GS. y col., 2011). A partir de este descubrimiento, se desarrollaron fármacos agonistas de PPAR γ : las tiazolidinedionas (TZDs) o glitazonas, que son utilizados para el tratamiento de la diabetes mellitus tipo II por su acción sensibilizadora a la glucemia en tejidos periféricos y por aumentar la expresión en membrana del transportador Glut-4 de glucosa (Hauner H., 2002). Los principales representantes de las TZDs son rosiglitazona, pioglitazona y ciglitazona (Cariou B. y col., 2012).

Además, PPAR γ puede ser activado por varios ligandos fisiológicos como el ácido docosahexaenoico, ácido linoleico, LDL y eicosanoides entre los que se destaca la prostaglandina 15-deoxi- $\Delta^{12,14}$ -PGJ2 (15dPGJ2), un derivado de PGJ2, producto de deshidratación de PGD2 (Moraes LA. y col., 2006). No se conocen ligandos antagonistas endógenos de PPAR γ , aunque su actividad transcripcional está inhibida por la unión de moléculas co-represoras. Sin embargo, existen antagonistas sintéticos.

Los tres subtipos de PPAR (α , β/δ y γ), se encuentran en el núcleo de manera constitutiva e inactiva, formando un complejo con moléculas co-represoras que inhiben la transcripción génica (McKenna NJ. y col., 2002). Para que estos receptores sean activos como factores de transcripción deben, no sólo acoplar un ligando agonista a su estructura, sino también formar un dímero con el receptor del ácido retinoico (RXR) (Kodera Y. y col., 2000).

3.1.1. PPAR γ y la modulación de la respuesta inflamatoria

La expresión de PPAR γ en macrófagos humanos y murinos fue descrita por primera vez en 1998 por tres grupos de investigación diferentes (Jiang C. y col., 1998; Ricote M. y col., 1998; Tontonoz P. y col., 1998). Los estudios iniciales llevados a cabo por los laboratorios de Seed (Jiang C. y col., 1998) indicaban que la activación farmacológica de PPAR γ atenuaba la expresión de moléculas proinflamatorias como IL-1 β , TNF- α e IL-6 en estas células. Un estudio más exhaustivo de este mecanismo mostró que PPAR γ posee un efecto represor sobre diversos factores de transcripción, como NF- κ B (por interacción con p50 y p65) (Chung SW. y col., 2000), AP-1 (al interactuar con c-Jun) (Subbaramaiah K. y col., 2001; Wang N. y col., 2002) y STAT1 (Daynes RA. y col., 2002). Al activarse, PPAR γ "secuestra" los coactivadores presentes en el núcleo, de tal manera que estos no están disponibles para otros factores de transcripción. Este método de inhibición se conoce como trans-represión transcripcional. Además puede interactuar físicamente con otros factores de transcripción (por ejemplo con la subunidad RelA/p65 de NF- κ B) impidiendo su funcionamiento: este fenómeno se conoce como acoplamiento cruzado. Así, la activación de PPAR γ tiene la capacidad de inhibir la actividad de factores de transcripción implicados en la inflamación,

disminuyendo la expresión de sus genes diana que comprenden citoquinas y sus receptores, moléculas de adhesión y enzimas inducibles.

3.1.2. 15-deoxi- $\Delta^{12,14}$ -PGJ₂ (15dPGJ₂): Ligando natural de PPAR γ

La prostaglandina 15dPGJ₂ fue descrita por primera vez en 1983 como un producto de degradación de PGD₂ (Fitzpatrick FA. y col., 1983) y en 1995 se descubrió que 15dPGJ₂ era un ligando específico del subtipo γ de los PPAR (Forman BM. y col., 1995; Kliewer SA. y col., 1995). Aunque la afinidad de 15dPGJ₂ por PPAR γ (Kd=300 nM, aprox.) es significativamente menor que la de las hormonas esteroideas por sus receptores intracelulares, representa el ligando natural más específico para PPAR γ (Berger J. y col., 2002).

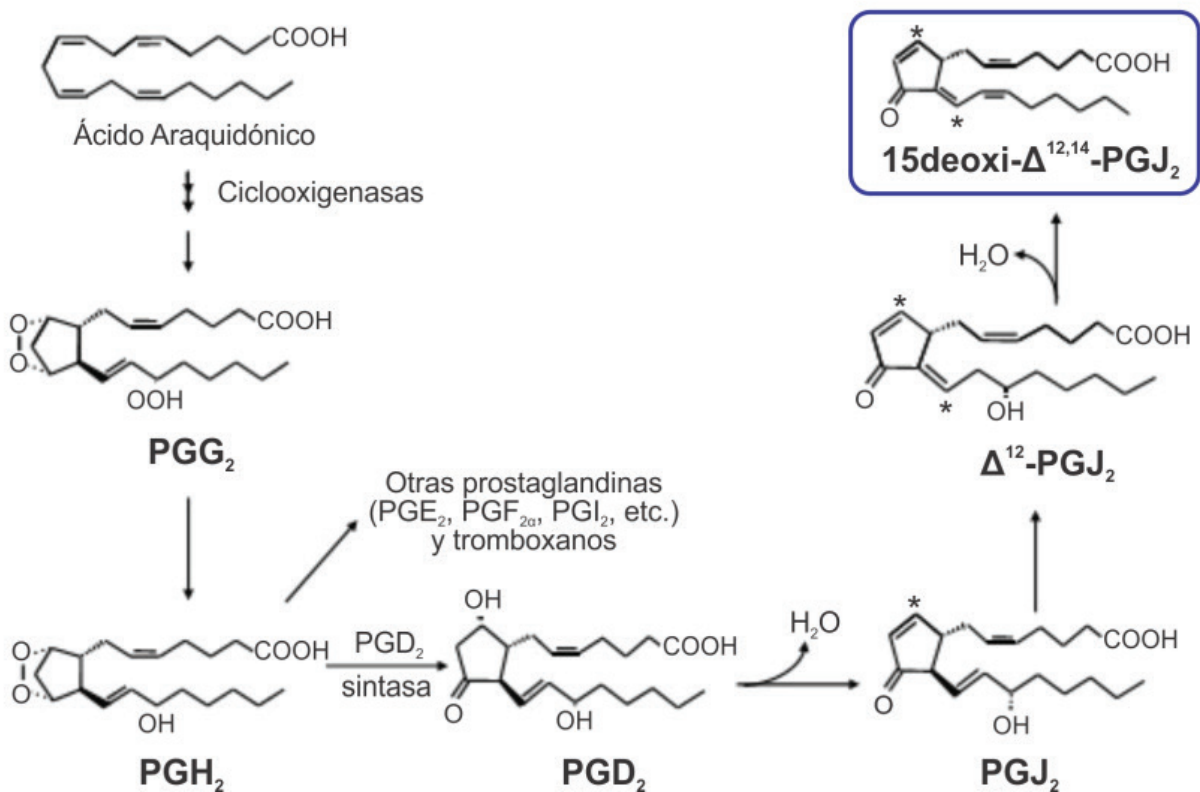


Figura 3. Esquema de síntesis de 15deoxi $\Delta^{12,14}$ prostaglandina J₂.

Ha sido ampliamente descrito que 15dPGJ₂ puede ejercer efectos que involucrarían acciones independientes de PPAR γ , ya que éstos son demasiado rápidos como para modular la expresión génica vía su receptor. Por ejemplo, ha sido demostrado que 15dPGJ₂ inhibe la activación de la vía de NF- κ B impidiendo la degradación de las proteínas inhibitorias I κ B por inhibición del complejo IKK. Ha sido documentado que esto último también se debe a que 15dPGJ₂ ejerce modificaciones de tipo covalentes sobre los dominios de unión al ADN de las subunidades p50 y p65 (Sher JU. y col., 2009). Asimismo, nuestro grupo ha demostrado en cultivos primarios de miocardiocitos estimulados con LPS que 15dPGJ₂, pero no rosiglitazona, inhibe la respuesta inflamatoria de manera independiente de PPAR γ (Hovsepian E. y col., 2010).

OBJETIVOS

1. Objetivo general

- I. Estudiar en un modelo murino de infección experimental con *T. cruzi* los efectos del tratamiento con 15-Deoxi- $\Delta^{12,14}$ Prostaglandina J2 (15dPGJ2) sobre la carga parasitaria y mediadores inflamatorios en corazón, hígado, bazo y músculo esquelético.

2. Objetivos específicos

- I. Caracterizar los efectos de 15dPGJ2 sobre la carga parasitaria, en corazón, hígado, bazo y músculo esquelético de ratones infectados con *T. cruzi*.
- II. Evaluar los efectos del tratamiento con 15dPGJ2 sobre la expresión de mediadores inflamatorios como NOS2 y citoquinas, en corazón, hígado, bazo y músculo esquelético de ratones infectados con *T. cruzi*.

MATERIALES Y MÉTODOS

1. Reactivos

- Para el tratamiento *in vivo* de los ratones, se utilizó el agonista de PPAR γ , 15-deoxi- $\Delta^{12,14}$ PGJ2 de Cayman Chemical Co.
- Los anticuerpos empleados fueron de Santa Cruz Biotechnology Inc. (anti-NOS2) y de Sigma-Aldrich Co., (α -actina y los anticuerpos secundarios conjugados con HRP o FITC).
- Los reactivos utilizados para las técnicas de electroforesis fueron adquiridos en Bio-Rad Laboratories. La membrana de PVDF Immobilon-P empleada en la transferencia de proteínas fue adquirida en MilliporeTM (Biopore), y los reactivos quimioluminiscentes fueron suministrados por Sigma-Aldrich Co. El tampón de lisis OGP para la obtención de extractos proteicos totales también fue de Sigma-Aldrich Co., así como la combinación de inhibidores de Proteasas (*Protease Inhibitor Cocktail*). El Nonidet P-40 10% fue de Roche Applied Science. El reactivo para la determinación de la concentración de proteínas (Bio-Rad Protein Assay) fue adquirido en Bio-Rad Laboratories y la BSA fue de Sigma-Aldrich Co.
- El Trizol, la transcriptasa reversa (M-MVL) y el inhibidor de ribonucleasas (RNAsa OUTTM), así como los cebadores utilizados en las PCR cuantitativas a tiempo real fueron de Life Technologies, Inc. El kit de DNAsa utilizado fue de Promega, el oligo dT utilizado fue de Biodymanics S.R.L. y el reactivo empleado en las Q-RT-PCR fue 5x HOT FIREPol Eva Green qPCR Mix Plus (ROX), de Solis Biodyne, adquirido en Biocientífica S.A.
- Para la extracción de ADN genómico se utilizó la Proteinasa K, aislada de hongos, de Invitrogen (Alemania). El etanol, el 2 propanol, el éter y el cloroformo fueron adquiridos en Merck, mientras que el alcohol isoamílico fue proporcionado por Mallinckrodt. Por último, utilizamos Fenol de Carlo Erba (Francia).

2. Modelo *in vivo*

2.1. Ratones

Se utilizaron ratones BALB/c de 8 semanas de edad, de sexo masculino. Estos fueron infectados con parásitos de la cepa RA de *T. cruzi* y sacrificados por dislocación cervical. Los ratones fueron mantenidos en el bioterio del Departamento de Microbiología, Parasitología e Inmunología de la Facultad de Medicina-UBA. Los animales se mantuvieron en grupos de 4-6 por jaula, recibieron la dieta habitual de bioterio (alimento balanceado) y se respetaron los ciclos de 10 horas de luz y 14 horas de oscuridad. En todos los experimentos, la dieta y el agua fueron administradas ad libitum. El cuidado de los animales se llevo

a cabo según normas institucionales. Todos los animales fueron aprobados por el comité institucional para el uso y cuidado de animales de laboratorio y el colegio de médicos de la Universidad de Buenos Aires, Argentina. Los protocolos se rigen por las normas de la Administración Nacional de Medicamentos, Alimentos y Tecnología Médica (ANMAT), Servicio Nacional de Sanidad y Calidad Agroalimentaria (SENASA), y están basados en las guías de uso y cuidado de animales de laboratorio del Instituto Nacional de Salud de Estados Unidos.

2.2. Parásitos

En este trabajo de tesis se utilizaron tripomastigotes de la cepa RA de *T. cruzi*, aislada de un paciente en la etapa aguda de la enfermedad de Chagas por González Cappa SM, y colaboradores en 1981; actualmente perteneciente al linaje VI, (Zingales B. y col., 2009). Esta cepa es mantenida en el laboratorio mediante pasajes sucesivos en ratón, por inoculación de 1×10^5 tripomastigotes por vía intraperitoneal (ip) cada 7 días. Para este fin, los animales son sacrificados en el pico de parasitemia, 10 días post infección (dpi) y sangrados en esterilidad por punción cardíaca.

La sangre obtenida es diluida 5:1 en medio de cultivo RPMI (suministrado por Life Technologies Inc. (Gibco™), el SFB utilizado fue de Internegocios S.A., los antibióticos penicilina y estreptomina fueron adquiridos en Sigma-Aldrich Co. al igual que la tripsina de páncreas porcino), centrifugada a 400g durante 7 minutos a temperatura ambiente, y mantenida en baño a 37°C por 1 hora. Los tripomastigotes del sobrenadante son aislados y centrifugados a 5000g durante 5 minutos a temperatura ambiente. El sobrenadante es descartado y el recuento de parásitos se realiza en cámara de Neubauer.

2.3. Drogas y tratamiento

Para la obtención del modelo de infección con *T. cruzi* se utilizaron ratones de la cepa BALB/c de dos meses de edad. En el modelo letal utilizado, los ratones fueron inoculados con 1×10^5 parásitos, por vía ip, de la cepa RA de *T. cruzi*. Los ratones BALB/c sin infectar o infectados fueron tratados diariamente con la prostaglandina 15dPGJ2 (1mg/Kg por vía ip). Se incluyeron los siguientes grupos experimentales:

- Ratones sin infección.
- Ratones sin infección y tratados con la prostaglandina 15dPGJ2.
- Ratones infectados con la cepa RA de *T. cruzi*.
- Ratones infectados con RA de *T. cruzi* y tratados con 15dPGJ2.

3. Determinación del parasitismo

3.1. Parasitemia

A diferentes dpi se obtuvo sangre a partir de un corte en el extremo de la cola de ratones infectados tratados y no tratados con 15dPGJ2. Dicha sangre se diluyó cinco veces en buffer de lisis (150 mM NH₄Cl, 0.1 mM EDTA, and 10 mM KHCO₃, pH 7,4) para luego medir la parasitemia en cámara de Neubauer.

3.2. Parasitismo tisular

Para analizar si el tratamiento con 15dPGJ2 afecta al número y tamaño de nidos de amastigotes en los tejidos estudiados (corazón, hígado, bazo y músculo esquelético), los órganos de ratones tratados y no tratados con 15dPGJ2 fueron fijados y embebidos en parafina. Seis secciones no contiguas de 5µm de espesor fueron cortadas y teñidas con Hematoxilina-Eosina. El número y tamaño de nidos de amastigotes se examinaron usando el microscopio Nikon Eclipse 600 (Nikon Inc). Las imágenes fueron capturadas usando una cámara digital Spot RT. Al menos 30 campos (400X) al azar se examinaron en cada sección (Mirkin GA. y col., 1994).

3.3. Carga parasitaria

3.3.1. Extracción de ADN

Se extrajo ADN genómico de ratones infectados e infectados y tratados con 15dPGJ2. Para ello, 50mg de cada tejido fueron disgregados manualmente utilizando 600mL de PBS 1X estéril. El producto fue centrifugado a 15.000 rpm durante 10min a 4°C. Al cabo del tiempo indicado el sobrenadante fue descartado y el pellet se incubó toda la noche con 20 μ L de Proteinasa K (0,6mg/mL) y 600 μ L de Buffer de lisis a 50°C.

Al día siguiente se agregó un volumen (600 μ L) de Fenol:Clorof:Isoamílico (25:24:1) y se agitó vigorosamente para luego volver a centrifugar en las mismas condiciones anteriores. Una vez finalizada se observaron 3 fases de las cuales se extrajo la capa acuosa superior. A la misma se le añadió 1 volumen de cloroformo, se lo agitó vigorosamente y luego se centrifugó a 15000rpm durante 10 min a 4°C.

Luego se separó la fase acuosa y se le agregó éter etílico (la misma cantidad que se recuperó) y se incubó a 50°C hasta que el éter sea evaporado totalmente.

Al pellet seco se le agregaron 50 μ L de acetato de amonio (10M) y 1 volumen de isopropanol a -20°C. Luego se centrifugó durante 20min a 4°C y a 15.000rpm. El sobrenadante fue descartado, el pellet (ADN genómico) se lavó con etanol 70% y se volvió a centrifugar manteniendo las mismas condiciones. Para finalizar, se retiró el sobrenadante, se secó el ADNg a 37°C y se resuspendió en TRIS:EDTA 10:1.

3.3.2. Cuantificación del ADN

Se realizaron diluciones 1/40 del ADNg con agua bidestilada y se procedió con la cuantificación del mismo mediante la utilización del espectrofotómetro UV-160A (UV visible recording spectrophotometer, SHIMADZU). Se tomaron 2 longitudes de onda para medir la absorbancia: λ_1 260nm y λ_2 280nm, obteniendo una relación óptima de $\lambda_1 / \lambda_2 = 1.9$ en la mayoría de los casos.

El ADNg fue llevado a una concentración final de 25ng/ μ L y almacenado a -20°C.

3.3.3. Preparación del ADN y PCR cuantitativa a tiempo real (Q-RT-PCR)

Con el fin de confeccionar una curva estándar de parásitos equivalentes de *Trypanosoma cruzi* para cada uno de los tejidos estudiados, se tomaron 50mg de tejido sin infección parasitaria y se los infectó con 10⁷ tripomastigotes. De esta manera se procedió con la extracción de ADN genómico descrita anteriormente.

A continuación se realizaron diluciones seriadas 1/10 del ADNg obtenido utilizando como diluyente ADNg 25ng/mL sin infectar, hasta obtener una concentración final de 10¹ parásitos equivalentes/50ng de ADNg. Una vez obtenido cada uno de los puntos para construir la curva estándar, se procedió con la Q-RT-PCR.

Los ensayos de Q-RT-PCR fueron realizados con el reactivo Eva Green y bajo la utilización de un detector de secuencias Applied Biosystems 7500. Las secuencias de los cebadores, diseñadas con el programa Primer Express (Applied Biosystems), se muestran en la tabla 1. Se utilizó la secuencia de ADN satélite, altamente repetitivo, TCZ específico de *T. cruzi* (Cummings KL. y Tarleton RL., 2003). Como gen normalizador o control de carga, se utilizó un gen de única copia, tumor necrosis factor- α (TNF- α).

El protocolo de Q-RT-PCR consta de distintas fases: una etapa inicial de desnaturalización (95°C – 15min) y luego 40 ciclos de 95°C-15seg, 65°C o 62°C (dependiendo del primer – tabla 1)-30seg y 72°C-1seg.

4. Sobrevida

Se evaluó la sobrevida de los ratones infectados con *T. cruzi*, tratados y no tratados con 15dPGJ2, mediante el test de Kaplan-Meier.

5. Medición de parámetros inflamatorios

5.1. Extracción de ARN total

Se extrajo ARN total de corazón, hígado, bazo y músculo esquelético de ratones infectados con *T. cruzi* o infectados y tratados (15dPGJ2) mediante la utilización del reactivo Trizol, siguiendo las instrucciones del proveedor. El ARN total obtenido fue tratado con ADNsa. La concentración de ARN de cada muestra fue determinada mediante espectrofotometría a una absorbancia de 260nm. La pureza del ARN fue determinada con la razón entre 260-280nm. El ARN total (1µg por muestra) fue transcrito en reversa, mediante la utilización de oligo dT y dNTPs, según indicaciones del fabricante de la transcriptasa reversa.

5.2. RT PCR cuantitativa y a tiempo real (Q-RT-PCR)

Se realizaron Q-RT-PCR con el reactivo EvaGreen (Solis Biodyne) mediante un detector de secuencias Applied Biosystems 7700. En el protocolo de PCR utilizamos pares de primers específicos (Tabla 1). El protocolo de PCR utilizado fue 50°C por 2min, 95°C por 15 min, 40 ciclos de 95°C por 15seg, 60°C por 30seg, 70°C por 1min, mas curva de disociación. Los valores de todas las muestras fueron cuantificados mediante el método relativo de comparación de ciclo-umbral (Ct) (Applied Biosystems), normalizadas con la expresión del ARN de 18S ribosomal y comparada con sus respectivos controles. La Master Mix de la reacción estuvo constituida por 14,6µl agua bi destilada estéril, 10µM de cada primer y 3µl de Evagreen, al cual se le agregaron 2µl de la muestra en una dilución 1:10 (Hovsepian E. y col., 2011).

TNF- α	F: 5'-GCTCTTGCCCACAMGGGTGC-3' R: 5'-CCAAGCAGCGGATAGTTCAG-3'
TCZ	F: 5'-TCCCTCTCATCAGTTCTATGGCCC-3' R: 5'-CAGCAAGCATCTATGCACTTAGACCCC-3'
18s	F: 5'-AACACGGGAAACCTCACCC-3' R: 5'-CCACCAACTAAGAACGGCC-3'
IL-6	F: 5'-TGATGCACTTGCAGAAAACAA-3' R: 5'-GGTCTTGGTCCTTAGCCACTC-3'
TNF	F: 5'-ATGAGCACAGAAAGCATGATC-3' R: 5'-TACAGGCTTGTCACTCGAATT-3'

Tabla 1. Secuencia de los primers utilizados en Q-RT-PCR en tiempo real.

5.3. Preparación de extractos proteicos

Los corazones homogeneizados con ultraturrax fueron resuspendidos en 300µl de tampón H (Hepes 10mM pH 7,9, EDTA 1mM, EGTA 1mM y KCl 10mM) conteniendo DTT 1mM, PMSF 0,5mM, FNa 100mM, NaVO 200mM y una combinación de inhibidores de Proteasas (AEBSF 104mM, Aprotinina 80µM, Bestatina 4mM, E-64 1,4mM, Leupeptina Pepstatina A 1,5mM). Los homogenatos fueron mantenidos en hielo por 15min al cabo de los cuales se les agregó Nonidet P-40 10% y se los agitó vigorosamente por 15seg y centrifugó en frío a 1600g durante 30seg. El precipitado fue resuspendido en 70µl de tampón C frío (Hepes 20mM pH 7,9, NaCl 0,4M, EDTA 1mM, EGTA 1mM, glicerol 20% y todos los 2mM y componentes e inhibidores mencionados anteriormente), y se lo agitó durante 30min a 4°C. El sobrenadante obtenido fue centrifugado 15min a 1600g y 4°C y almacenado a -80°C (extracto nuclear) (Goren NB. y col., 2004).

Para la obtención de los extractos proteicos totales, los corazones de los ratones fueron homogeneizados con ultraturrax en 300µl de tampón de lisis OGP. Luego se mantuvo en cámara refrigerada

durante 30min y en agitación constante. Rápidamente, se las centrifugó a 7000g a 4°C durante 15min. El sobrenadante obtenido fue traspasado a un tubo limpio y mantenido a -20°C.

5.4. Cuantificación de proteínas

La determinación de proteínas se realizó según el método descrito por Bradford (Bradford MM., 1976) utilizando el reactivo Bio-Rad Protein Assay y BSA (1mg/mL) como patrón. La concentración de proteína presente en cada muestra se calculó a partir de la curva patrón medida a una absorbancia de 595nm.

5.5. Análisis de proteínas mediante Western blot (Wb)

Los extractos de proteínas, previos a ser sometidos a electroforesis, fueron calentados a 95°C durante 10min con tampón Laemmli (Tris-HCl 60mM pH 6,8, SDS 2%, glicerol 10%, β -mercaptoetanol 3% y azul de bromofenol 0,005%). Las muestras conteniendo la misma cantidad de proteínas (50 μ g) fueron sometidas a electroforesis (90min a 90-120 volts) en geles de poliacrilamida al 10-12% SDS-poliacrilamida (acrilamida/bisacrilamida, 29,2:0,8) en condiciones desnaturalizantes. Finalizada la electroforesis, las proteínas fueron transferidas a membranas Immobilon-P a una intensidad constante de 400mA por 130min. Luego, las membranas fueron bloqueadas durante 1h a temperatura ambiente con una solución de leche descremada en polvo al 5% en PBS 1X, tras lo cual se incubaron toda la noche a 4°C con los anticuerpos primarios específicos indicados, diluidos en PBS 1X. Transcurrido este tiempo, las membranas se lavaron con PBS-Tween (PBS 1X y Tween-20 0,1%) y se incubaron durante 1h a temperatura ambiente con el segundo anticuerpo conjugado con peroxidasa.

Finalizada la incubación, se realizaron 3 lavados de 10min con PBS 1X-Tween y las membranas fueron reveladas mediante ECL en un gabinete Image Quant 300 (GE Healthcare) siguiendo las instrucciones del fabricante. La Intensidad de las bandas se analizó utilizando el programa NIH Image J (NIH, USA).

6. Análisis estadísticos

Los resultados se expresan como la media \pm desviación estándar (DE) de por lo menos tres experimentos independientes. Los valores *P* fueron determinados usando el test de Student o el de Tukey para valores no paramétricos. La significación estadística se define en cada caso en las figuras y $p < 0,05$ fue considerado como significativo. Los análisis estadísticos se realizaron utilizando el programa GraphPad Prism 4.0.

RESULTADOS

1. Caracterización del modelo *in vivo* de infección aguda con cepa letal (RA) de *Trypanosoma cruzi*

1.1. Parasitismo

Distintas cepas de *T. cruzi* han sido estudiadas y caracterizadas, diferenciándose entre ellas según distintos parámetros como el tropismo tisular, el grado de virulencia, la velocidad de multiplicación, entre otros. La cepa letal RA de *T. cruzi*, considerada pantrópica y reticulotrópica, desencadena una infección aguda en el hospedador.

Para caracterizar nuestro modelo de trabajo, se infectaron ratones BALB/c de 8 semanas de edad con la cepa RA y luego se analizaron los niveles de parásitos en sangre. Como podemos observar en la figura 1 los ratones infectados muestran un incremento significativo de la parasitemia al día 6 post-infección (dpi) y un pico en la misma a los 10dpi. Ninguno de los ratones infectados sobrevive al día 15pi, debido al alto grado de virulencia de la cepa RA.

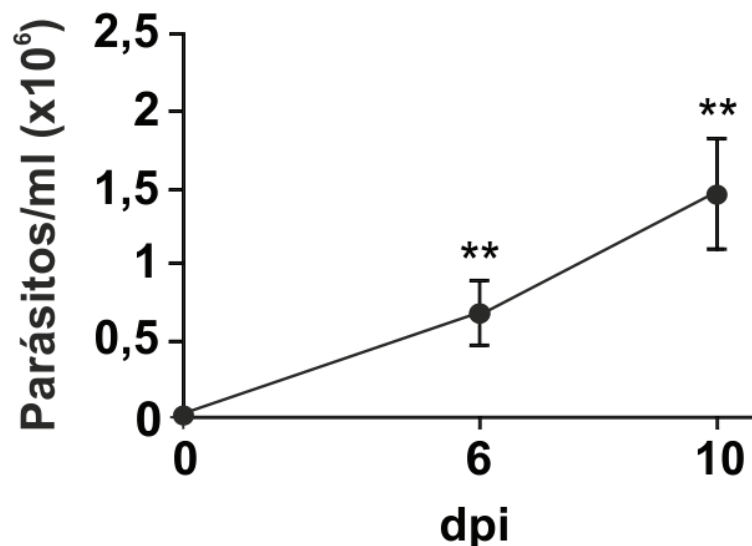


Figura 1. Parasitemia de ratones infectados con la cepa RA de *T. cruzi*. Los ratones fueron infectados con $1 \cdot 10^5$ parásitos y se evaluó el número de parásitos en sangre a los 6 y 10 dpi. Los resultados se expresan como la media \pm DE de 3 experimentos, con 8 ratones por grupo. ** $p < 0.05$ vs. control sin infección.

Con el fin de evidenciar el parasitismo tisular se realizaron cortes histológicos de corazón, hígado, bazo y músculo esquelético. Se efectuó la coloración con Hematoxilina-Eosina y se procedió a analizar cada corte en búsqueda de la presencia del parásito, ya sea en forma libre o formando nidos de amastigotes. Mediante observación al microscopio óptico, se pudo corroborar que en los ratones infectados con la cepa RA de *T. cruzi*, el parásito invade distintos tejidos como el hígado y el bazo, y que el corazón es su principal órgano blanco. Mediante esta técnica no se pudo evidenciar la presencia del parásito en músculo esquelético (figura 2).

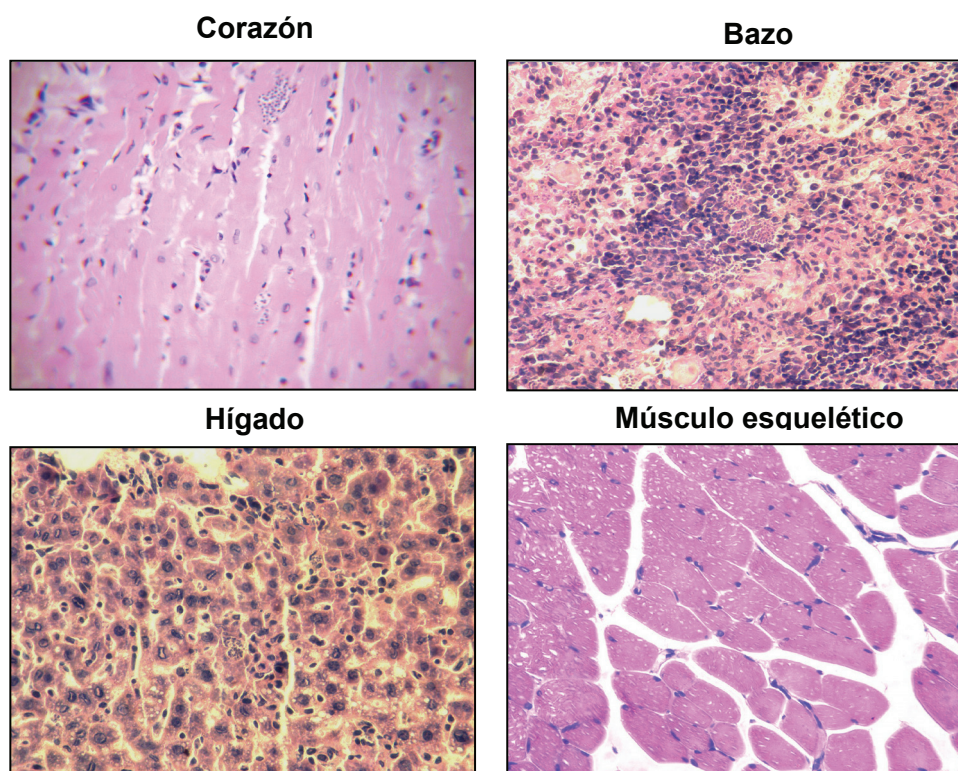


FIGURA 2. Parasitismo tisular. La presencia del parásito en los tejidos se analizó mediante cortes histológicos teñidos con Hematoxilina-Eosina en corazón, hígado, bazo y músculo esquelético de ratones BALB/c infectados con la cepa RA de *T. cruzi*. Las flechas indican nidos de amastigotes. Barra: 50 μ m. Las micrografías (400x) son representativas de tres experimentos con 4 ratones por grupo.

1.2. Carga parasitaria

Una vez realizado el estudio histológico de los 4 tejidos blanco, nos propusimos analizar la carga parasitaria a través de un método más sensible como la PCR cuantitativa a tiempo real (Q-RT-PCR). Para ello se puso a punto la técnica y se procedió a cuantificar los parásitos en cada tejido.

1.2.1. Curva estándar de TCZ

En primer lugar, se realizó una curva estándar para cada uno de los tejidos estudiados: corazón, hígado, bazo y músculo esquelético. Para ello, 50mg de cada uno de los tejidos estudiados fue infectado con 10^7 parásitos de la cepa RA de *T. cruzi* del cual se realizó la extracción de ADN genómico. Una vez cuantificado el ADN genómico de cada tejido, estos se llevaron a una concentración de 25ng/ μ L. A continuación y para cada uno de los tejidos, se realizaron diluciones seriadas 1/10 de las muestras en un rango de 10^7 - 10^0 parásitos equivalentes. Se utilizó como diluyente ADN genómico de muestras control sin infectar de cada tejido, utilizando también una concentración de 25ng/ μ L, como fue descrito por Cummings y Tarleton 2003.

Una vez obtenidas las diluciones de los tejidos estudiados se procedió a realizar las Q-RT-PCR utilizando primers específicos para la secuencia repetitiva o ADN satélite TCZ de *T. cruzi*. La figura 3a muestra los valores de los números de ciclos o ciclo umbral (ct) de las diluciones seriadas del tejido cardíaco. Con el objeto de corroborar que todos los puntos de la curva contengan la misma cantidad de ADN (25ng/ μ L) se evaluó la expresión del gen TNF- α como normalizador, ya que este posee una sola copia en el genoma del ratón (Fig. 3b). Podemos observar que todas las muestras estudiadas coinciden en un valor similar de ct, indicando una cantidad semejante o comparable de ADN genómico. Con el propósito de confirmar que

los productos de amplificación de TCZ y TNF- α son específicos, se realizaron los controles característicos mediante curvas de disociación o melting (datos no mostrados).

La normalización fue posible ya que en la amplificación de las secuencias de TCZ y de TNF- α (control de carga) se obtuvo una eficiencia similar (TCZ: 1,07, R²: 0,9987; TNF- α : 1,12, R²: 0,9994), habiendo utilizado la siguiente fórmula para calcularla: **E: 10^(-1/pendiente)**

A continuación, a partir de los datos obtenidos de la Q-RT-PCR del gen TCZ se realizó una curva para establecer el límite de detección de parásitos equivalentes. En todos los órganos estudiados el límite de detección fue de 10 parásitos equivalentes.

Finalmente, en la figura 3c se muestra la curva que se genera por el logaritmo de las concentraciones de parásitos en cada uno de los puntos de la curva estándar respecto a los valores de TCZ en cada uno de estos puntos. Esta curva nos permitirá determinar la cantidad de parásitos equivalentes/50ng de ADN de muestras incógnitas de tejido cardíaco.

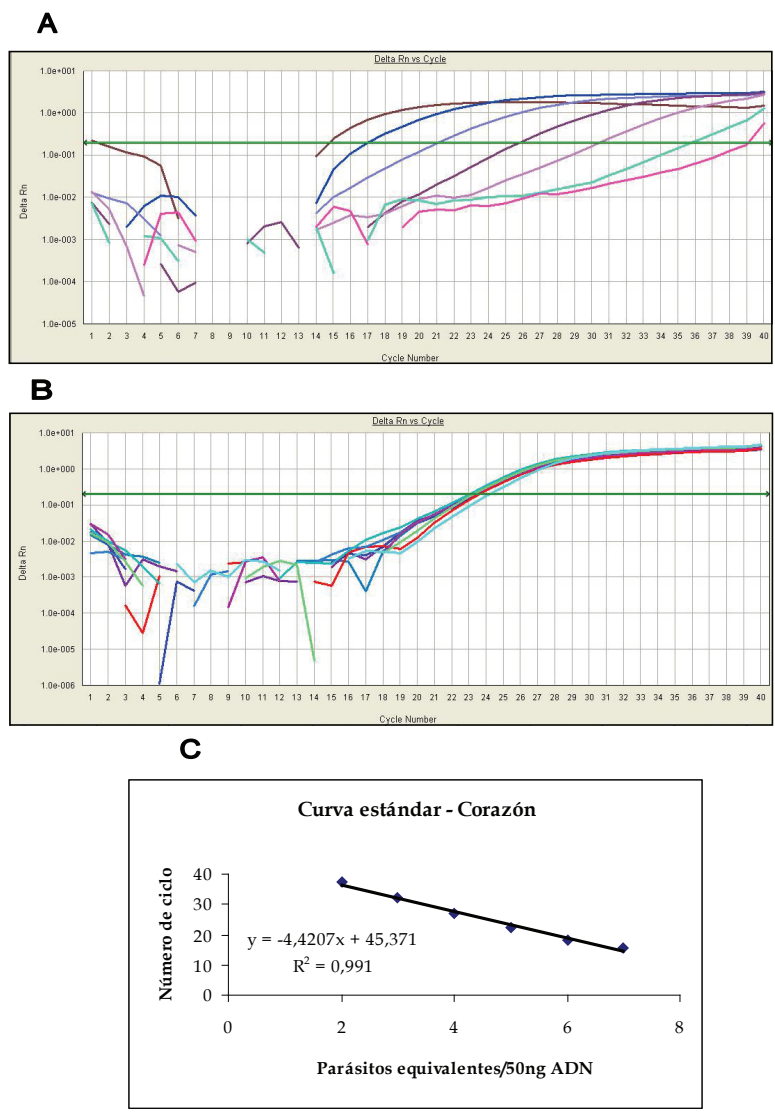


Figura 3. Curva estándar generada a partir de extractos de ADN genómico de corazón infectado con 10⁷ tripomastigotes. (A) Curvas de amplificación representativas generadas con primers específicos para secuencias altamente repetitivas de ADN satélite de *T. cruzi* (TCZ) a partir de diluciones seriadas 1/10 de las muestras infectadas. (B) Curvas de amplificación representativas generadas con primers específicos para el gen normalizador o control de carga TNF- α a partir de diluciones seriadas 1/10. (C) Curva estándar creada a partir de las diluciones seriadas. La eficiencia de amplificación para cada primer estuvo determinada por la ecuación E: 10^(-1/pendiente). Para A, B y C los resultados muestran un experimento representativo de tres.

De la misma manera realizamos la curva estándar de TCZ para hígado (Fig.4) donde experimentalmente observamos que, al igual que en el tejido cardíaco, el límite de detección fue de 10^2 parásitos equivalentes

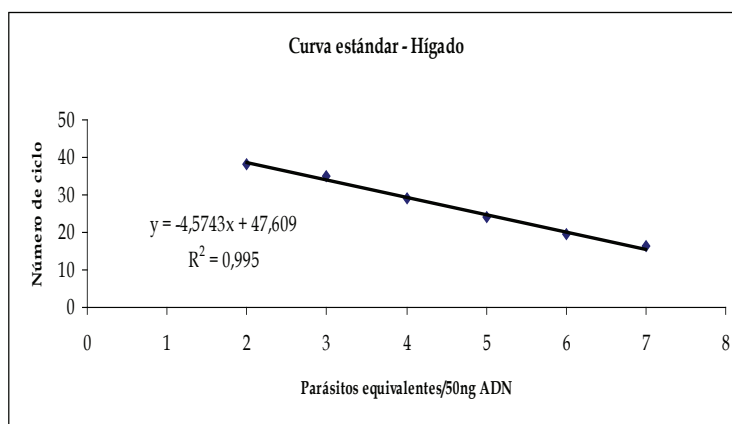


Figura 4. Curva estándar generada a partir de extractos de ADN genómico de hígado infectado con 10^7 tripomastigotes. La curva estándar fue creada a partir de las diluciones seriadas. La eficiencia de amplificación para cada primer estuvo determinada por la ecuación E: $10^{(-1/\text{pendiente})}$. Los resultados muestran un experimento representativo de tres.

Asimismo, las figuras 5 y 6 muestran las curvas estándar de TCZ obtenidas para bazo y músculo esquelético. Podemos destacar que, en el caso del bazo, el límite de detección fue de 10^1 parásitos y en músculo esquelético fue de 10^3 parásitos a diferencia de los 2 órganos anteriores.

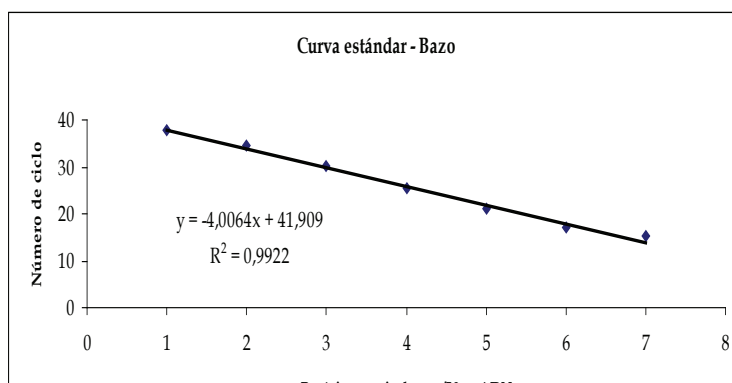


Figura 5. Curva estándar generada a partir de extractos de ADN genómico de bazo infectado con 10^7 tripomastigotes. Una curva estándar fue creada a partir de las diluciones seriadas. La eficiencia de amplificación para cada primer estuvo determinada por la ecuación E: $10^{(-1/\text{pendiente})}$. Los resultados muestran un experimento representativo de tres.

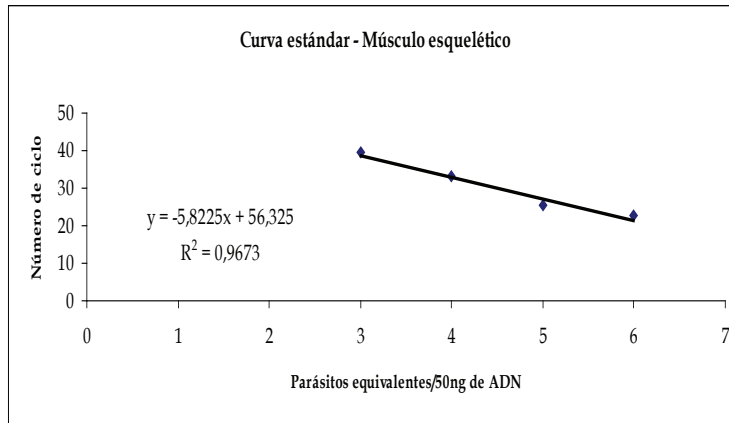


Figura 6. Curva estándar generada a partir de extractos de ADN genómico de músculo esquelético infectado con 10^7 tripomastigotes. Curva estándar creada a partir de las diluciones seriadas. La eficiencia de amplificación para cada primer estuvo determinada por la ecuación E: $10^{(-1/pendiente)}$. Los resultados muestran un experimento representativo de tres.

1.2.2. Cuantificación de carga parasitaria

Una vez obtenida la curva estándar para cada uno de los tejidos, nos abocamos a cuantificar la carga parasitaria en los órganos provenientes de los ratones infectados con *T. cruzi*. Para ello, los ratones fueron sacrificados a los 10dpi y se aisló ADN genómico de los 4 tejidos estudiados. A partir de 50ng de ADN genómico, se realizaron las Q-RT-PCR del gen TCZ y TNF- α para normalizar. La figura 7 muestra el número de parásitos equivalentes/50ng de ADN genómico en corazón, hígado, bazo y músculo esquelético.

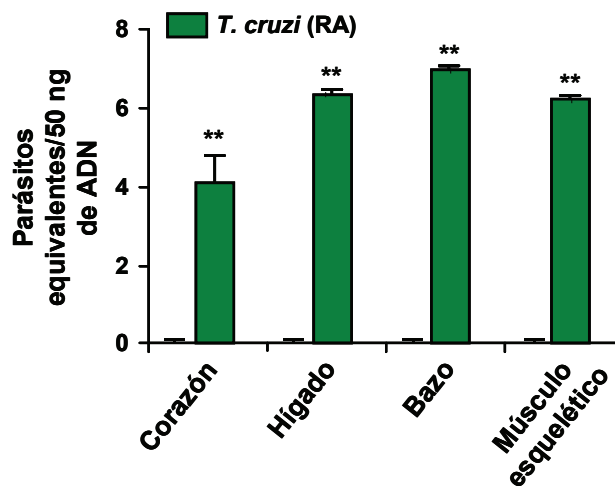


Figura 7. Carga parasitaria detectada por Q-RT-PCR. Los ratones fueron infectados con la cepa RA y sacrificados a los 10dpi. Los ensayos de Q-RT-PCR se realizaron a partir de extractos de corazones, hígados, bazos y músculos esqueléticos infectados. En los controles sin infección no se detectó amplificación. Se utilizaron primers específicos para la secuencia repetitiva TCZ de *T. cruzi*. Se normalizó con el gen TNF- α . Los resultados son la media \pm DE (n=3). ** p<0.05 vs. control sin infección.

1.3. Expresión de mediadores inflamatorios

1.3.1. Expresión y activación de NOS2

Como se ha descrito anteriormente, la enzima inducible NOS2 cumple un rol importante en la respuesta inflamatoria generada tras la infección con distintos patógenos. Esta enzima es la responsable de la liberación de grandes cantidades de óxido nítrico (NO), metabolito inflamatorio con capacidad antimicrobiana. Sin embargo ante la infección con *T. cruzi*, una excesiva producción de NO puede ser perjudicial para los tejidos invadidos.

Conociendo el tropismo de la cepa RA de *T. cruzi* nos propusimos analizar si, tras la infección de los ratones con esta cepa, se expresa la enzima NOS2 en corazón, hígado, bazo y músculo esquelético. Para ello, se realizaron ensayos de Wb a partir de extractos proteicos totales de los órganos estudiados de ratones infectados y ratones control sin infectar. Utilizando un anticuerpo específico contra NOS2, se pudieron medir los niveles de expresión de esta enzima inducible típicamente inflamatoria en ambos grupos de ratones. Como se observa en la figura 7, la infección con *T. cruzi* induce un aumento significativo en la expresión de NOS2 en cada uno de los órganos de los ratones infectados, al compararlos con los ratones control sin infectar. Asimismo, se puede establecer una correlación entre los niveles de parasitemia y los niveles de expresión de NOS2 ya que, el día en que se expresa la enzima NOS2 (6dpi), coincide con el día en que la parasitemia se vuelve significativa. En ambos casos, el pico se da a los 10dpi.

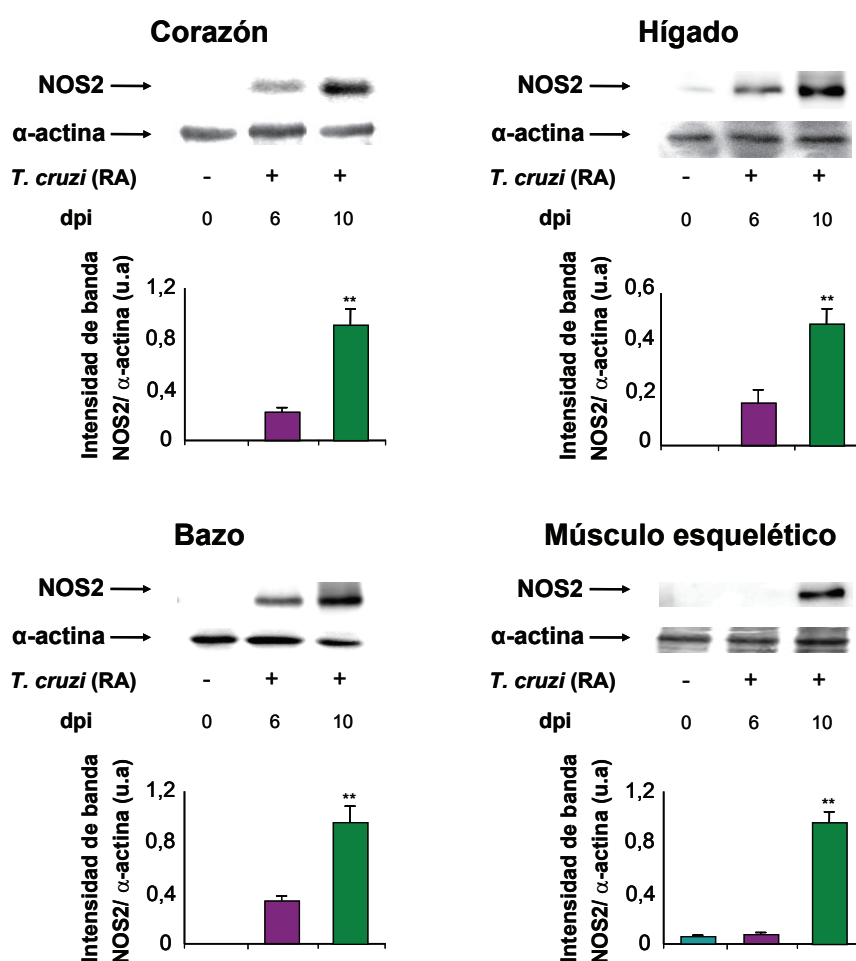


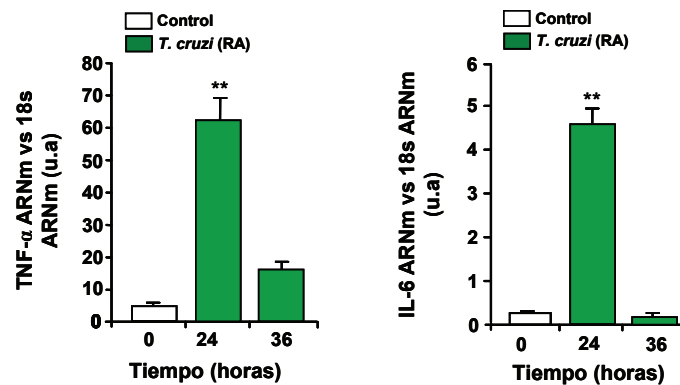
Figura 8. Expresión de NOS2 en corazón, hígado, bazo y músculo esquelético en ratones BALB/c infectados con cepa RA de *T. cruzi*. Mediante Wb se detectaron los niveles de expresión de NOS2 con anticuerpos específicos, en ratones infectados con 1.10^5 parásitos. Los resultados muestran un experimento representativo de tres y se expresan como la media \pm DE . ** $p < 0.05$ vs. control sin infección

1.3.2. Expresión de citoquinas pro inflamatorias

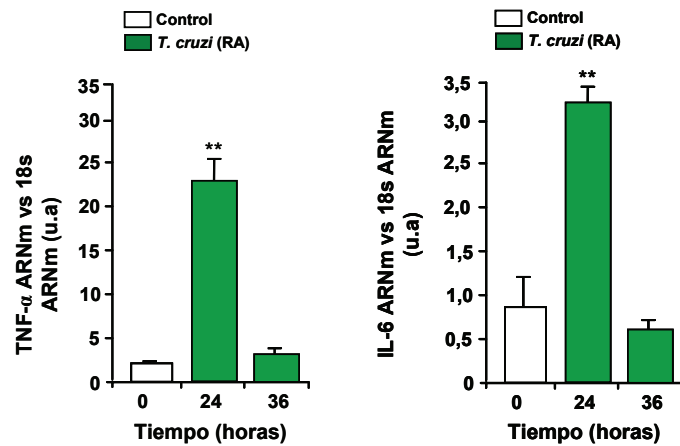
Además de la expresión de la enzima NOS2 y la liberación del NO ante una infección con *T. cruzi*, existen otros parámetros inflamatorios comúnmente estudiados como son las citoquinas pro inflamatorias. Entre la amplia familia de citoquinas existentes, unas de las más relevantes ante la infección con *T. cruzi* son TNF- α e IL-6, que cumplen un importante rol en la modulación de la respuesta inflamatoria.

Con el fin de evaluar la expresión de IL-6 y TNF- α en nuestro modelo de infección aguda y compararlo con ratones sin infectar, se midió mediante Q-RT-PCR la expresión a nivel de ARN mensajero de ambas citoquinas en corazón, hígado, bazo y músculo esquelético, en cada grupo de ratones. Como se observa en la figura 9, se realizó una cinética de expresión de ambas citoquinas para cada tejido estudiado. En los ratones control no se observa expresión de IL-6 y TNF- α , mientras que en aquellos infectados con la cepa RA de *T. cruzi* se evidencia un pico en los niveles de expresión a nivel de ARN mensajero de ambas citoquinas a las 24h post infección en todos los tejidos estudiados. Se observa también que, si bien disminuye significativamente, la expresión de estas citoquinas proinflamatorias se mantienen detectables hasta las 36 horas post infección.

Corazón



Hígado



Bazo

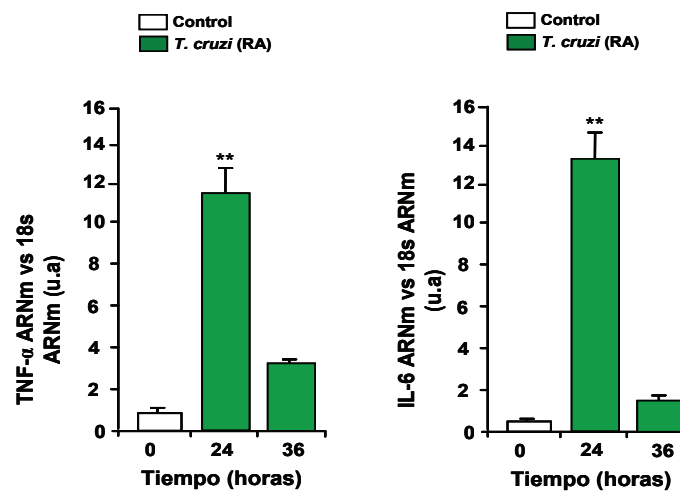


Figura 9. Expresión de citoquinas pro inflamatorias en ratones infectados con *T. cruzi*. Los ratones fueron infectados con la cepa RA y sacrificados a las 24 y 36 horas post infección. Los ensayos de Q-RT-PCR se realizaron a partir de extractos de corazones, hígados y bazos infectados. Se analizó la expresión de ARNm de TNF- α e IL-6. Los resultados se normalizaron frente al ARNr 18S. Los resultados muestran la media \pm DE (n=3). ** p<0.05 vs. control sin infección.

2. Papel de 15dPGJ2 en los diferentes tejidos en la etapa aguda de la infección con *T. cruzi*

Ante la infección con *T. cruzi*, el hospedador desata en su organismo una intensa respuesta inflamatoria con el fin de controlar la proliferación del patógeno. Si la misma resulta excesiva y prolongada en el tiempo puede, además de combatir al parásito, causar daños en los tejidos del hospedador y, en algunos casos, hasta la muerte del mismo. Debido a esto, el hospedador busca un equilibrio entre la intensidad de la respuesta inflamatoria y la presencia del parásito dando lugar, en la mayoría de los casos, a una infección crónica asintomática. Aquellos individuos que no logran establecer un correcto equilibrio, suelen desarrollar síntomas que comprometen sobre todo al tejido cardíaco.

En el presente trabajo nos propusimos estudiar el papel de 15dPGJ2, ligando natural del receptor nuclear PPAR γ , en la modulación de la respuesta inflamatoria causada ante una infección aguda con la cepa RA de *T. cruzi* en corazón, hígado, bazo y músculo esquelético.

2.1. Papel de 15dPGJ2 sobre la parasitemia y carga parasitaria

Basándonos en resultados anteriores y sabiendo que ante una infección con *T. cruzi* el parásito ingresa al torrente sanguíneo e infecta diversos tejidos blanco, en esta segunda parte del trabajo comenzamos por preguntarnos que efectos tiene el tratamiento con 15dPGJ2 sobre la parasitemia en ratones infectados.

Al comparar los ratones infectados y tratados con los ratones sólo infectados observamos que, si bien ambos grupos muestran un aumento significativo de la parasitemia al día 6pi, al día 10pi los ratones tratados con 15dPGJ2 generan un aumento significativo del número de parásitos en sangre en relación a los ratones no tratados (Fig. 10).

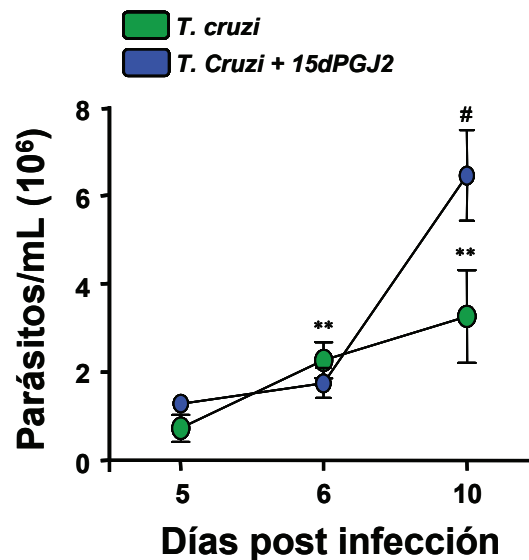


Figura 10. Acción de 15dPGJ2 sobre la parasitemia. Los ratones fueron infectados con 1.10^5 parásitos o infectados y tratados diariamente con 15dPGJ2 (1mg/Kg) y se evaluó el número de parásitos en sangre a los 5, 6 y 10 dpi. Los resultados se expresan como la media \pm DE de 3 experimentos, con 8 ratones por grupo. ** $p < 0.05$ vs. control sin infección. # $p < 0.05$ vs. infección con *T. cruzi*.

Con el fin de evaluar si el tratamiento con 15dPGJ2 tiene efectos sobre el parasitismo tisular, nos propusimos cuantificar los parásitos presentes en corazón, hígado, bazo y músculo esquelético de ratones infectados y tratados con esta prostaglandina. Para ello, los ratones infectados y tratados fueron sacrificados a los 10 dpi y se aisló ADN genómico de los 4 tejidos estudiados. A partir de 50 ng de ADN genómico, se

realizaron las Q-RT-PCR del gen TCZ y TNF- α para normalizar. Una vez obtenidos los datos de los ct, y ya normalizados, se extrapolaron las cifras en las curvas estándar confeccionadas anteriormente para cada tejido estudiado y, de esta manera, se obtuvieron los números de parásitos equivalentes/50 ng de ADN genómico en corazón, hígado, bazo y músculo esquelético.

Si observamos la figura 11, podemos decir que aquellos ratones infectados y tratados con 15dPGJ2 presentan una tendencia al aumento de la carga parasitaria.

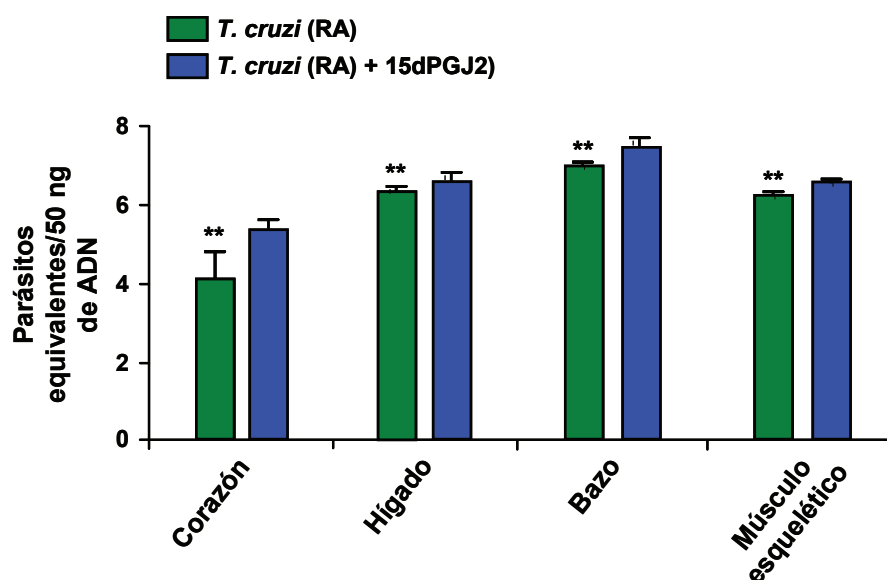


FIGURA 11. Carga parasitaria detectada por Q-RT-PCR. Los ratones fueron infectados con la cepa RA y sacrificados a los 10 dpi. Los ensayos de Q-RT-PCR se realizaron a partir de extractos de corazones, hígados, bazos y músculos esqueléticos infectados o infectados y tratados con 15dPGJ2 (1mg/Kg). Se generó una curva estándar para determinar la carga parasitaria. Se utilizaron primers específicos para la secuencia repetitiva TCZ de *T. cruzi*. Se normalizó con el gen TNF. Los resultados son la media \pm DE (n=3).

2.2. Papel de 15dPGJ2 sobre mediadores inflamatorios

Una vez que evaluamos los efectos de 15dPGJ2 sobre el parásito, ya sea analizando los niveles de parasitemia o la presencia del patógeno en los cuatro tejidos blanco, decidimos estudiar los efectos del tratamiento en cuanto a la respuesta inflamatoria del hospedador. Para ello, y buscando también una explicación al aumento del parasitismo, evaluamos la acción de 15dPGJ2 sobre la enzima típicamente inflamatoria NOS2 en corazón, hígado, bazo y músculo esquelético. Basándonos en resultados anteriores, donde el pico de expresión de la enzima NOS2 es a los 10dpi, los ratones infectados y tratados fueron sacrificados en ese tiempo. Luego, mediante ensayos de Wb evidenciamos que en los ratones infectados con la cepa RA de *T. cruzi* y tratados con la prostaglandina 15dPGJ2 hay una disminución altamente significativa en los niveles de expresión de esta enzima a un nivel casi basal, en todos los órganos estudiados (Fig. 12).

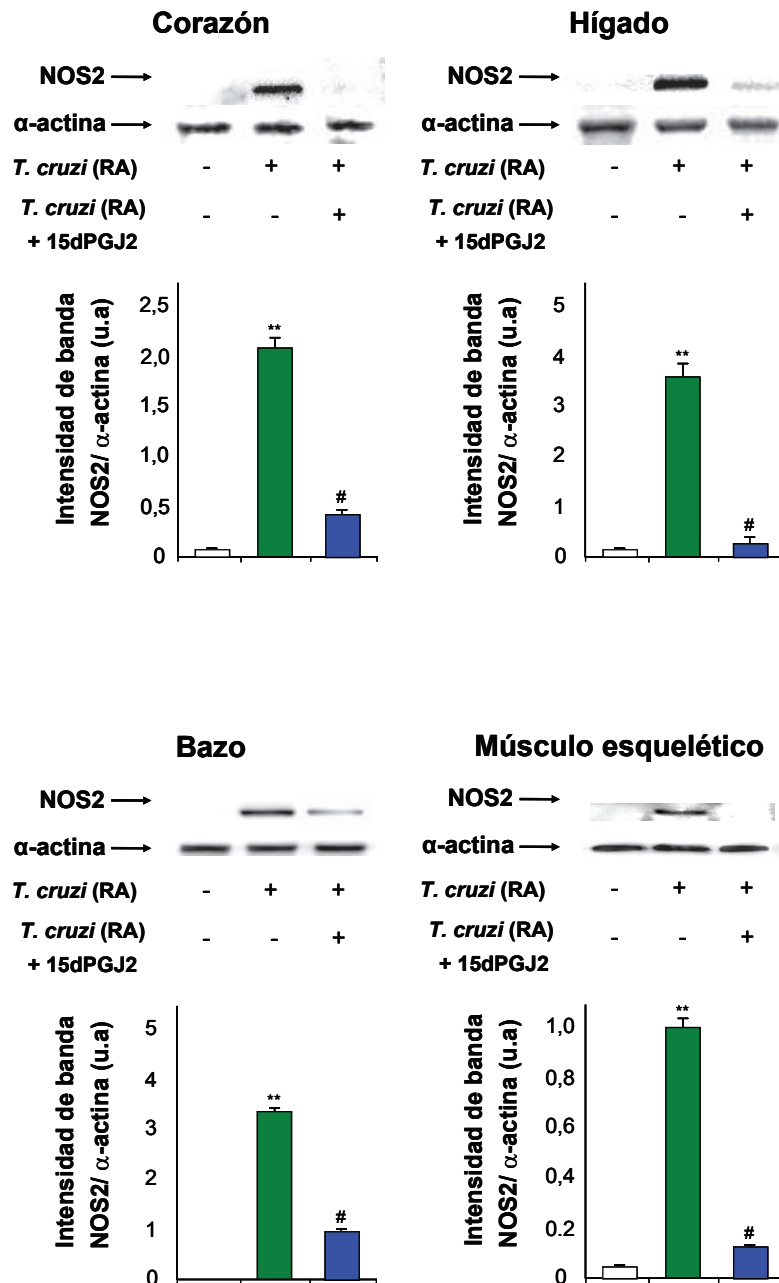


FIGURA 12 Efecto de 15dPGJ2 sobre la expresión de NOS2. Los ratones fueron infectados con 1.10^5 parásitos y tratados diariamente con 15dPGJ2 (1mg/Kg), luego sacrificados a los 10 dpi. Los resultados son representativos de 3 experimentos y se expresan como la media \pm DE. ** $p < 0.05$ vs. control sin infección. # $p < 0.05$ vs. infección con *T. cruzi* (RA).

Estos resultados se correlacionan con los obtenidos anteriormente ya que, al haber baja expresión de NOS2 disminuye la cantidad de NO liberado y, por lo tanto, disminuyen también sus efectos antimicrobianos. De esta manera, el parásito se encuentra con menos resistencia a su propagación por parte del hospedador y logra así aumentar los niveles de parasitemia.

Habiendo ya estudiado los efectos de esta prostaglandina sobre la expresión de la enzima NOS2, el siguiente parámetro que nos propusimos analizar fue su efecto sobre la expresión de las citoquinas pro inflamatorias IL-6 y TNF- α , consideradas importantes mediadores de la inflamación ante un infección con *T. cruzi*.

Para este fin, realizamos una cinética de expresión del ARN mensajero de estas citoquinas en corazón, hígado, bazo y músculo esquelético. Como observamos en la figura 13, el tratamiento diario con 15dPGJ2 disminuye de manera significativa los niveles de ambas citoquinas pro inflamatorias a las 24 horas post infección, tiempo en el cual los niveles de expresión de estas citoquinas ante una infección alcanzan sus niveles máximos.

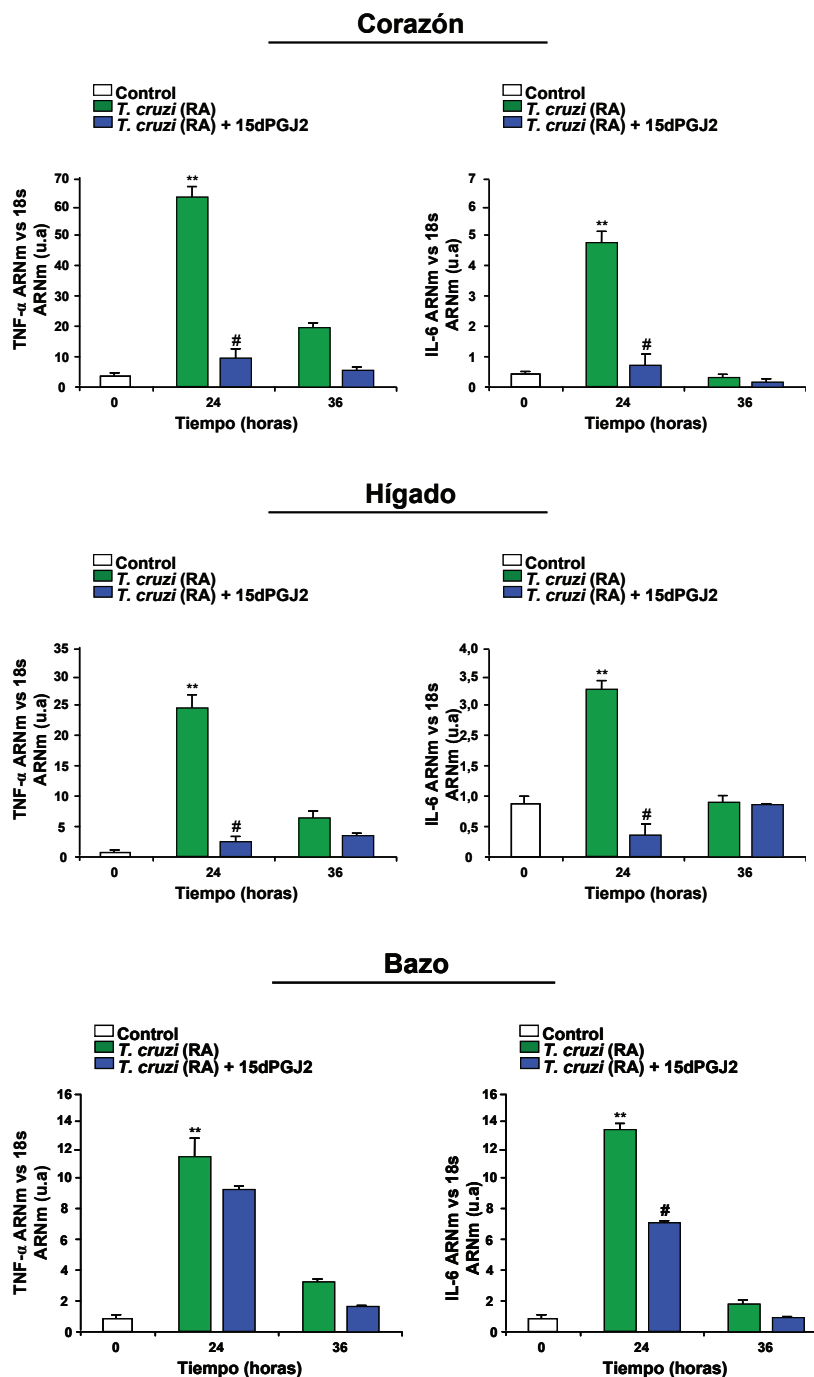


Figura 13. Efecto de 15dPGJ2 en la expresión de citoquinas pro inflamatorias. La prostaglandina

15dPGJ2 regula la expresión de citoquinas pro inflamatorias en corazones de ratones infectados con *T. cruzi*. Los ratones fueron infectados con la cepa RA y sacrificados a las 24 y 36 horas post infección. Los ensayos de Q-RT-PCR se realizaron a partir de extractos de corazones, hígados y bazos infectados o infectados y tratados con 15dPGJ2 (1mg/Kg). Se analizó la expresión de ARNm de TNF- α e IL-6. Los resultados se normalizaron frente al ARNr 18S. Los resultados muestran la media de 3 experimentos realizados. ** $p < 0,05$ vs. control sin infección. # $p < 0,05$ vs. infección con *T. cruzi* (RA).

DISCUSIÓN

En este estudio nos hemos propuesto investigar la habilidad de 15dPGJ2 para modular la respuesta inflamatoria que se desata luego de la infección con *T. cruzi*, en un modelo experimental *in vivo*. La cepa RA de *T. cruzi* posee una alta letalidad en ratón y se caracteriza por ser reticulotrópica-pantrópica. Si bien los tripomastigotes infectivos tienen como órganos blanco primarios el tejido muscular (cardíaco, esquelético o liso) y células del sistema fagocítico-mononuclear, pueden invadir también cualquier tipo de célula nucleada. Es importante señalar que en la fase aguda de la infección se desencadenan procesos inflamatorios en los diferentes tejidos invadidos por el parásito que, además de promover el reclutamiento de células mononucleares, generan la producción de citoquinas pro inflamatorias y la expresión de enzimas inflamatorias que persisten incluso en la etapa crónica de la enfermedad.

Considerando estas premisas, caracterizamos el modelo de trabajo y comprobamos que la infección con la cepa RA de *T. cruzi* genera un pico en la parasitemia a los 10dpi, (evaluado en cámara de Neubauer) que coincide con lo que ha sido descrito en un trabajo realizado con la misma cepa RA de *T. cruzi* en ratones BALB/c (Penas FN. y col., 2013). Más aun, en este trabajo de tesina se puso a punto en nuestro laboratorio una técnica de cuantificación, mediante Q-RT-PCR, del parasitismo en diferentes tejidos invadidos por el parásito. La técnica de PCR en tiempo real permite la cuantificación exacta y sensible de la carga parasitaria de tejido en los animales infectados. La utilidad de este método quedó demostrada ya que se confirmó una mayor carga parasitaria en ratones con infecciones agudas en comparación con los ratones infectados crónicamente. En ese trabajo, también observaron una mayor carga parasitaria en los tejidos que recibieron dosis infectivas superiores y la persistencia de los parásitos en los tejidos de diferentes hospedadores infectados a su vez con diferentes cepas de *T. cruzi* (Cummings KL. y Tarleton RL., 2003). Además, estos autores proponen a este método como una herramienta útil para el seguimiento de la carga de parásitos en huéspedes bajo diferentes regímenes de tratamiento.

También pudimos comprobar al realizar cortes histológicos teñidos con hematoxilina-eosina de corazón, hígado y bazo la presencia de los típicos nidos de amastigotes descritos en el curso de la infección. Si bien las manifestaciones cardíacas y las complicaciones gastrointestinales son las que caracterizan a la enfermedad de Chagas, (Tanowitz HB. Y col., 1992; Marinho CR. y col., 2004) detectamos también la presencia de parásitos en otros órganos.

Igualmente, el modelo resultó reproducible respecto a la sobrevivencia de los ratones infectados ya que fueron inoculados con igual cantidad de parásitos que en el trabajo realizado por Penas y colaboradores (Penas FN y col., 2013).

El paso siguiente fue demostrar que la cepa RA tiene la capacidad de inducir la expresión de NOS2 en todos los tejidos estudiados, mostrando la expresión de dicha enzima inflamatoria a los 6dpi. En trabajos en los que utilizan diversos modelos de infección con *T. cruzi*, se destaca el aumento de la expresión de NOS2 en distintos tejidos frente a la infección (Álvarez MN. y col., 2011; Pinge-Filho P. y col., 2005; Saefel M. y col., 2001). Se ha reportado que las cepas Tulahuén e Y de *T. cruzi* son capaces de inducir la expresión de NOS2 en corazón coincidiendo con el pico de parasitemia (Cuervo H. y col., 2008). Asimismo, destaca el papel que se adjudica al NO en el control de la multiplicación del parásito *in vivo*. En este sentido, en otro trabajo del grupo determinamos la expresión de NOS2 y una alta liberación de NO en cardiomiocitos neonatales de ratón infectados con la cepa RA *in vitro* (Hovsepian E. y col., 2011). Por otra parte, en trabajos en los que utilizan ratones *knock out* (KO) para NOS2 revelaron que dichos ratones pueden compensar la ausencia de la producción de NO con un aumento en la síntesis de citoquinas importantes en para el control inmunológico de la infección por *T. cruzi* (Cummings KL. y Tarleton RL., 2004). Llamativamente, ha sido reportado en un trabajo donde utilizan ratones KO para NOS2, que éstos son capaces de controlar igualmente la parasitemia y parasitismo de los tejidos cuando son infectados con una cepa no letal de *T. cruzi* (Marinho CR. y col., 2007). La explicación para estos resultados que parecen controvertidos, estaría en las diferencias a nivel genético entre diferentes cepas de parásitos o en la susceptibilidad de las cepas de ratones del modelo experimental.

En un trabajo previo del grupo se demostró que los cardiomiocitos neonatales de ratón expresan citoquinas inflamatorias como TNF- α e IL-6 frente a la infección con *T. cruzi* (Hovsepian E. y col., 2011). A igual resultado pudimos llegar al evaluar el tejido cardíaco en ratones BALB/c infectados con la cepa RA y K98 de *T. cruzi* (Penas FN. y col., 2013). De esta manera, al analizar el hígado y bazo en nuestro

modelo experimental de infección, también encontramos aumento en la expresión de TNF- α e IL-6 con un pico a las 24h post infección.

El papel de TNF- α ha sido ampliamente estudiado por el grupo de Tarleton desde 1988, en particular respecto al control y a la eliminación de los parásitos en las infecciones producidas por *T. cruzi*. Más recientemente Andrade y colaboradores (2008) han reportado que TNF- α regula la sobreproducción de NOS2, potenciando la actividad microbicida de los macrófagos al inducir la liberación de grandes cantidades de NO y promover el reclutamiento de las distintas poblaciones celulares necesarias para la total erradicación del patógeno.

Ha sido descrito por diversos autores la capacidad de 15dPGJ2 (ligando natural de PPAR γ) para modular la respuesta inflamatoria en un número de situaciones patológicas, aunque los detalles de su mecanismo de acción siguen siendo objeto de nuevos estudios. Los ligandos de PPAR γ ejercen efectos antiinflamatorios en modelos experimentales de artritis (Bordji K. y col., 2000; Fahmi H. y col., 2001; Kawahito Y. y col., 2000), injuria cardíaca por isquemia y reperfusión (Nakajima A. y col., 2001), enfermedad inflamatoria intestinal (Su CG. y col., 1999; Lewis JD. y col., 2001; Wada K. y col., 2001), Alzheimer (Combs CK. y col., 2000; Heneka MT. y col., 2000; Landreth GE. y col., 2001) y lupus y nefritis (Reilly CM. y col., 2000; Reilly CM. y col., 2001). Más aún, se ha descrito que el ligando natural de PPAR γ , 15dPGJ2, protege frente a falla multiorgánica asociada a endotoxemia (Collin M. y col., 2004).

Este trabajo en particular se focaliza en el estudio del papel de 15dPGJ2 sobre distintos órganos en un modelo experimental *in vivo* de infección con *T. cruzi*. Trabajos previos de nuestro grupo mostraron que 15dPGJ2 es un potente modulador de los procesos inflamatorios a través de mecanismos dependientes e independientes de PPAR γ , tanto en cardiomiocitos neonatales en cultivo como en corazones de ratones infectados con la cepa RA de *T. cruzi* (Hovsepian E. y col., 2011; Penas FN. y col., 2013). Los resultados de este trabajo revelan que el tratamiento con 15dPGJ2 inhibe la expresión de citoquinas proinflamatorias como TNF- α e IL-6, así como la expresión de NOS2 en hígado, bazo y músculo esquelético de ratones infectados. También confirma los resultados anteriores sobre el papel anti inflamatorio de 15dPGJ2 en los corazones de ratones infectados con la cepa RA. Es importante destacar el rol del NO, ya que éste es requerido por su actividad parasiticida intracelular, subrayando la importancia de este metabolito en el control de la multiplicación intracelular del parásito durante la infección con *T. cruzi*. En este sentido, un trabajo que emplea ratones KO para NOS2 demuestra que, durante una infección aguda, estos ratones cuentan con una parasitemia elevada comparada con la de los ratones del grupo control (Holscher C. y col., 1998). A pesar de ello, una síntesis excesiva de este metabolito puede resultar en un daño para el miocardio (Machado FS. y col., 2000; Machado FS. y col., 2008).

Al analizar la parasitemia, observamos que el número de tripomastigotes fue más alto en los ratones tratados que en los no tratados. De hecho, en cultivos de cardiomiocitos neonatales infectados con la cepa RA de *T. cruzi* y tratados con 15dPGJ2, también se observó un aumento del parasitismo (Hovsepian E. y col., 2011). El mismo resultado se obtuvo en nuestro grupo al analizar los corazones de ratones sometidos al tratamiento con 15dPGJ2 en el modelo de infección *in vivo* (Penas FN. y col., 2013) probablemente debido a la inhibición de la expresión de NOS2 y la consiguiente inhibición de la producción de NO. Por otra parte nuestros resultados confirman que el tratamiento con 15dPGJ2 genera una tendencia al aumento del parasitismo en corazón y en los otros órganos estudiados. A pesar de ello, no hemos encontrado diferencias respecto a la mortalidad entre los grupos de ratones infectados tratados o no tratados. Esto podría deberse al balance que se genera entre la inhibición o menor expresión de citoquinas pro inflamatorias y el aumento de la síntesis de IL-10 que conduciría a la cronicidad de la infección o a la supervivencia de los ratones (Penas FN. y col., 2013). Por su parte y en concordancia con nuestros resultados, Adapala y Chan encontraron en un modelo murino de infección con *Leishmania donovani*, que la administración de curcumina (que actuaría como ligando de PPAR γ) a largo plazo activa este receptor y aumenta la carga parasitaria en hígado y bazo, desactivando así la respuesta inmune de tipo 1 e inhibiendo a la NOS2 (Adapala N. y col., 2008).

Estos resultados de conjunto muestran que el tratamiento con 15dPGJ2 modula la expresión de NOS2 y de citoquinas inflamatorias en el corazón, hígado bazo y músculo esquelético de ratones infectados con la cepa RA de *T. cruzi*. A pesar de que el tratamiento genera una tendencia al aumento de la carga parasitaria en los diferentes tejidos, probablemente debido a la inhibición de NOS2 y a la posible disminución

de NO, los efectos de 15dPGJ2 como coadyuvante de la terapia parasiticida clásica podrían colaborar con la eliminación de los efectos deletéreos de la inflamación.

CONCLUSIONES

- I. La infección de ratones BALB/c con la cepa RA de *T. cruzi* induce la expresión de citoquinas pro inflamatorias, y la expresión y actividad de NOS2, enzima típicamente inflamatoria en corazón, hígado, bazo y músculo esquelético.
- II. La administración diaria del ligando natural de PPAR γ , 15dPGJ2, a ratones infectados con *T. cruzi* inhibe de manera significativa la expresión de citoquinas pro inflamatorias (TNF- α e IL-6) y de la enzima NOS2 en los tejidos estudiados.
- III. El tratamiento con 15dPGJ2 en ratones infectados con la cepa RA de *T. cruzi* no modifica de manera significativa la supervivencia de los animales, a pesar de provocar un aumento en la parasitemia de los ratones y mostrar una tendencia al aumento de la carga parasitaria en los órganos infectados.

BIBLIOGRAFÍA

1. **Adapala N., Chan MM.**, 2008. Long-term use of an antiinflammatory, curcumin, suppressed type 1 immunity and exacerbated visceral leishmaniasis in a chronic experimental model. *Lab Invest.* 88:1329-1339.
2. **Alsford S., Kelly JM., Baker N. y col.**, 2013. Genetic dissection of drug resistance in trypanosomes. *Parasitology.* 140 (12):1478-1491.
3. **Alvarez MN., Peluffo G., Piacenza L. y col.**, 2011. Intraphagosomal peroxynitrite as a macrophage-derived cytotoxin against internalized *Trypanosoma cruzi*: consequences for oxidative killing and role of microbial peroxiredoxins in infectivity. *J Biol Chem.* 286 (8):6627-6640.
4. **Alves C., de Melo N., Fraceto L., y col.**, 2011. Effects of 15d-PGJ2-loaded poly(D, L-lactide-co-glycolide) nanocapsules on inflammation. *Br J Pharmacol.* 162 (3):623-632.
5. **Andrade SG., Magalhães Ldos A., Pessina DH. y col.**, 2011. Importance of TNF- α in the course of acute infection with *Trypanosoma cruzi*: influence of its inhibition by pentoxifylline treatment. *Mem Inst Oswaldo Cruz.* 103 (1):21-26.
6. **Apt W., Arribada A., Zulantay I. y col.**, 2005. Itraconazole or allopurinol in the treatment of chronic American trypanosomiasis: the results of clinical and parasitological examinations 11 years post-treatment. *Ann Trop Med Parasitol.* 99 (8):733-741.
7. **Ba X., Gupta S., Davidson M. y col.**, 2010. *Trypanosoma cruzi* induces ROS-PARP-1-RelA pathway for up regulation of cytokine expression in cardiomyocytes. *J Biol Chem.* 285:11596-11606.
8. **Berger J., Moller DE.**, 2002. The mechanisms of action of PPARs. *Annu Rev Med.* 53:409-435.
9. **Bern C., Martin DL., Gilman RH.**, 2011. Acute and congenital Chagas disease. *Adv. Parasitol.* 75:19-47.
10. **Borda ES., Sterin-Borda L.**, 1996. Antiadrenergic and muscarinic receptor antibodies in Chagas' cardiomyopathy. *Int J Cardiol.* 54:149-156.
11. **Bordji K., Grillasca JP., Gouze JN. y col.**, 2000. Evidence for the presence of peroxisome proliferator-activated receptor (PPAR) alpha and gamma and retinoid Z receptor in cartilage. PPAR-gamma activation modulates the effects of interleukin-1beta on rat chondrocytes. *J Biol Chem.* 275 (16):12243-12250.
12. **Bradford MM.**, 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem.* 72:248-54.
13. **Brener Z., Andrade ZA., Barral-Neto M.**, 2000. O parasito e sua interacao com os hospedeiros in *Trypanosoma cruzi* e Doença de Chagas. Guanabara Koogan S.A. Brasil. Segunda edición.
14. **Cariou B, Charbonnel B, Staels B.**, 2012. Thiazolidinediones and PPAR γ agonists: time for a reassessment. *Trends Endocrinol Metab.* 23 (5):205-215.
15. **Castro JA., de Mecca MM., Bartel LC.**, 2006. Toxic side effects of drugs used to treat Chagas' disease (American trypanosomiasis). *Hum Exp Toxicol.* 25 (8):471-479.
16. **Chung SW., Kang BY., Kim SH. y col.**, 2000. Oxidized low density lipoprotein inhibits interleukin-12 production in lipopolysaccharide-activated mouse macrophages via direct interactions between peroxisome proliferator-activated receptor-gamma and nuclear factor-kappa B. *J Biol Chem.* 275:32681-32687.

17. **Collin M., Patel NS., Dugo L. y col.**, 2004. Role of peroxisome proliferator-activated receptor-gamma in the protection afforded by 15-Deoxy- $\Delta^{12,14}$ prostaglandin J2 against the multiple organ failure caused by endotoxin. *Crit. Care Med.* 32:826-831.
18. **Combs CK., Johnson DE., Karlo JC. y col.**, 2000. Inflammatory mechanisms in Alzheimer's disease: inhibition of beta-amyloid-stimulated proinflammatory responses and neurotoxicity by PPAR γ agonists. *J Neurosci.* 20 (2):558-567.
19. **Correa-Oliveira R., Gomes J. AS., Lemos EM.**, 1999. The role of the immune response on the development of severe clinical forms of human Chagas disease. *Memorias do Instituto Oswaldo Cruz.* 9 (1):253-255.
20. **Coura JR. y Vinas PA.**, 2010. Chagas disease: a new worldwide challenge. *Nature.* 465 (7301):S6-S7
21. **Cuervo H., Pineda MA., Aoki MP. y col.**, 2008. Inducible nitric oxide synthase and arginase expression in heart tissue during acute *Trypanosoma cruzi* infection in mice: arginase I is expressed in infiltrating CD68⁺ macrophages. *J Infect Dis.* 15; 197 (12):1772-1782.
22. **Cummings KL. y Tarleton RL.**, 2003. Rapid quantitation of *Trypanosoma cruzi* in host tissue by real-time PCR. *Molecular & Biochemical Parasitology.* 129 (1):53-59.
23. **Cummings KL. y Tarleton RL.**, 2004. Inducible nitric oxide synthase is not essential for control of *Trypanosoma cruzi* infection in mice. *Infect. Immun.* 72 (9):4081-4089.
24. **da Silveira AB., Lemos EM., Adad SJ. y col.**, 2007. Megacolon in Chagas disease: a study of inflammatory cells, enteric nerves, and glial cells. *Hum Pathol.* 38:1256-1264.
25. **Daynes RA., Jones DC.**, 2002. Emerging roles of PPARs in inflammation and immunity. *Nat Rev Immunol.* 2:748-759.
26. **Docampo R., de Souza W., Miranda K. y col.**, 2005. Acidocalcisomes-conserved from bacteria to man. *Nat Rev Microbiol.* 3 (3):251-261.
27. **Engel D., Peshock R., Armstrong RC. y col.**, 2004. Cardiac myocyte apoptosis provokes adverse cardiac remodeling in transgenic mice with targeted TNF overexpression. *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* 287:1303-1311.
28. **Escher P., Wahli W.**, 2000. Peroxisome proliferator-activated receptors: insight into multiple cellular functions. *Mutation Research.* 448 (2):121-138.
29. **Fahmi H., Di Battista JA., Pelletier JP. y col.**, 2001. Peroxisome proliferator-activated receptor gamma activators inhibit interleukin-1 β -induced nitric oxide and matrix metalloproteinase 13 production in human chondrocytes. *Arthritis Rheum.* 44:595-607.
30. **Ferreira RC, Ianni BM., Abel LC. y col.**, 2003. Increased plasma levels of tumor necrosis factor- α in asymptomatic/indeterminate and Chagas disease cardiomyopathy patients. *Mem Inst Oswaldo Cruz.* 98 (3):407-411.
31. Fitzpatrick FA., Wynalda MA., 1983. Albumin-catalyzed metabolism of prostaglandin D2. Identification of products formed in vitro. *J Biol Chem.* 258:11713-11718.
32. **Forman BM., Tontonoz P., Chen J. y col.**, 1995. 15-Deoxy- $\Delta^{12,14}$ -prostaglandin J2 is a ligand for the adipocyte determination factor PPAR γ . *Cell.* 83:803-812.
33. **Gallardo-Soler A., Gómez-Nieto C., Campo ML., y col.**, 2008. Arginase I induction by modified lipoproteins in macrophages: a peroxisome proliferator-activated receptor-gamma/delta-mediated effect that links lipid metabolism and immunity. *Mol Endocrinol.* 22 (6):1394-1402.

34. **Goin JC., Borda E., Leiros CP., y col., 1994.** Identification of antibodies with muscarinic cholinergic activity in human Chagas' disease: pathological implications. *J Auton Nerv Syst.* 47:45-52.
35. **Gomes JA., Bahia-Oliveira LM., Rocha MO. y col., 2003.** Evidence that development of severe cardiomyopathy in human Chagas' disease is due to a Th1-specific immune response. *Infect Immun.* 71:1185-1193.
36. **Goren N., Cuenca J., Martín-Sanz P. y col., 2004.** Attenuation of NF- κ B signalling in rat cardiomyocytes at birth restricts the induction of inflammatory genes. *Cardiovasc Res.* 64:289-97.
37. **Gutierrez FR., Mineo TW., Pavanelli WR. y col., 2009.** The effects of nitric oxide on the immune system during *Trypanosoma cruzi* infection. *Mem Inst Oswaldo Cruz.* 104:236-245.
38. **Gwechenberger M. Hülsmann M., Berger R. y col., 2004.** Interleukin-6 and B-type natriuretic peptide are independent predictors for worsening of heart failure in patients with progressive congestive heart failure. *Journ Heart Lung Transplant.* 23 (7):839-844.
39. **Harmon GS., Lam MT., Glass CK., 2011.** PPARs and lipid ligands in inflammation and metabolism. *Chemical Reviews.* 111 (10):6321-6340.
40. **Hauner H., 2002.** The mode of action of thiazolidinediones. *Diabetes Metab Res Rev.* 18 (2):10-15.
41. **Heneka MT., Klockgether T., Feinstein DL., 2000.** Peroxisome proliferator-activated receptor-gamma ligands reduce neuronal inducible nitric oxide synthase expression and cell death in vivo. *J Neurosci.* 20:6862-6867.
42. **Hölscher C., Köhler G., Müller U., Mossmann H. y col., 1998.** Defective nitric oxide effector functions lead to extreme susceptibility of *Trypanosoma cruzi*-infected mice deficient in gamma interferon receptor or inducible nitric oxide synthase. *Infect Immun.* 66:1208-1215.
43. **Hovsepian E., Penas FN., Goren NB., 2010.** 15-deoxy- $\Delta^{12,14}$ -Prostaglandin J2 but not osiglitazone regulates metalloproteinase 9, NOS2, and cyclooxygenase 2 expression and functions by peroxisome proliferator-activated receptor gamma-dependent and-independent mechanisms in cardiac cells. *Shock.* 34:60-67.
44. **Hovsepian E., Mirkin GA., Penas F. y col., 2011.** Modulation of inflammatory response and parasitism by 15-Deoxy-(12,14) prostaglandin J(2) in *Trypanosoma cruzi*-infected cardiomyocytes. *Int. J. Parasitol.* 41:553-562.
45. **Issemann I., Green S., 1990.** Activation of a member of the steroid hormone receptor superfamily by peroxisome proliferators. *Nature.* 347 (6294):645-650.
46. **Janczewski A., Lakatta EG., 2010.** Modulation of sarcoplasmic reticulum Ca²⁺ cycling in systolic and diastolic heart failure associated with aging. *Heart Fail Rev.* 15 (5):431-445.
47. **Jiang C., Ting AT., Seed B., 1998.** PPAR-gamma agonists inhibit production of monocyte inflammatory cytokines. *Nature.* 391:82-86.
48. **Kawahito Y., Kondo M., Tsubochi Y. y col., 2000.** 15-deoxy-delta(12,14)-PGJ(2) induces synovio-cyte apoptosis and suppresses adjuvant-induced arthritis in rats. *J Clin Invest.* 106 (2):189-197.
49. **Kleinert H., Pautz A., Linker K. y col., 2004.** Regulation of the expression of inducible nitric oxide synthase. *Eur J Pharmacol.* 500:255-266.
50. **Kliwer SA., Lenhard JM., Willson TM. y col., 1995.** A prostaglandin J2 metabolite binds peroxisome proliferator-activated receptor γ and promotes adipocyte differentiation. *Cell.* 83:813-819.

51. **Kodera Y., Takeyama K., Murayama A. y col.**, 2000. Ligand type-specific interactions of peroxisome proliferator-activated receptor gamma with transcriptional coactivators. *J Biol Chem.* 275:33201-33204.
52. **Landreth GE. y Heneka MT.**, 2001. Anti-inflammatory actions of peroxisome proliferator-activated receptor gamma agonists in Alzheimer's disease. *Neurobiol Aging.* (6):937-944.
53. **Lewis JD., Lichtenstein GR., Stein RB. y col.**, 2001. An open-label trial of the PPAR-gamma ligand rosiglitazone for active ulcerative colitis. *Am J Gastroenterol.* 96 (12):3323-3328.
54. **Lippitz BE.**, 2013. Cytokine patterns in patients with cancer: asystematic review. *The Lancet Oncology.* 14 (6):218-228.
55. **Machado FS., Martins GA., Aliberti JC. y col.**, 2000. *Trypanosoma cruzi*-infected cardiomyocytes produce chemokines and cytokines that trigger potent nitric oxide-dependent trypanocidal activity. *Circulation.* 102:3003-3008.
56. **Machado FS., Souto JT., Rossi MA. y col.**, 2008. Nitric oxide synthase-2 modulates chemokine production by *Trypanosoma cruzi*-infected cardiac myocytes. *Microbes Infect.* 10:1558-1566.
57. **Machado FS., Jelicks LA., Kirchhoff LV. y col.**, 2012. Chagas heart disease: report on recent developments. *Cardiol Rev.* 20 (2):53-65.
58. **Marinho CR., Nuñez-Apaza LN., Martins-Santos R. y col.**, 2007. IFN- γ , but not nitric oxide or specific IgG, is essential for the in vivo control of low-virulence Sylvio X10/4 *Trypanosoma cruzi* parasites *Scand. J Immunol.* 66 (23):297-308.
59. **Marinho CR., Bucci DZ., Dagli MLZ., y col.**, 2004. Pathology affects different organs in two mouse strains chronically infected by a *Trypanosoma cruzi* Clone: A Model for Genetic Studies of Chagas Disease. *Infect Immun.* 72 (4):2350-2357.
60. **Maya JD., Cassels BK., Iturriaga-Vásquez P. y col.**, 2007. Mode of action of natural and synthetic drugs against *Trypanosoma cruzi* and their interaction with the mammalian host. *Comp Biochem Physiol A Mol Integr Physiol.* 146 (4):601-620.
61. **Maya JD., Orellana M., Ferreira J., y col.**, 2010. Chagas disease: Present status of pathogenic mechanisms and chemotherapy. *Biol Res.* 43 (3):323-331.
62. **Mazza S.**, 1934. Casos agudos benignos de enfermedad de Chagas comprobados en la provincia de Jujuy. *MePRA.* 17:3-11.
63. **Mazza S, Montana A, Benitez C. y col.**, 1936. Transmisión de *Schizotrypanum cruzi* al niño por la leche de la madre con enfermedad de Chagas. *Publ MEPRA.* 28:41-46.
64. **Mazza S.**, 1943. Comprobaciones de *Triatoma platensis*, *Eutriatoma oswaldoi*, *Pastrongylus seai* y *Psamulester coreodes* en la provincia de Santiago del Estero, todas ellas sobre infestación por *T. cruzi*. Otros datos sobre infestación esquizotripanosómica natural silvestre de *Triatoma infestans*. *Prensa Médica Arg.* 30:1583-1595.
65. **McKenna NJ., O'Malley BW.**, 2002. Combinatorial control of gene expression by nuclear receptors and coregulators. *Cell.* 108:465-474.
66. **Médicos sin fronteras.**, 2003. Enfermedad de Chagas. www.msf.es/images/factsheet/CHAGAS.html.
67. **Mejia AM., Hall BS., Taylor MC. y col.**, 2012. Benznidazole-resistance in *Trypanosoma cruzi* is a readily acquired trait that can arise independently in a single population. *J Infect Dis.* 206 (2):220-228.

68. **Mirkin GA., Jones M., Sanz OP. y col.**, 1994. Experimental Chagas' disease: electrophysiology and cell composition of the neuromyopathic inflammatory lesions in mice infected with a myotropic and a pantropic strain of *Trypanosoma cruzi*. *Clin Immunol Immunopathol.* 73 (1):69-79.
69. **Moraes LA., Piqueras L., Bishop-Bailey D.**, 2006. Peroxisome proliferator-activated receptors and inflammation. *Pharmacol Ther.* 110:371-385.
70. **Mosmann T., Kobie J., Eun-Hyung L. y col.**, 2009. T helper cytokine patterns: defined subsets, random expression, and external modulation. *Immunol Res.* 45:173-184.
71. **Nakajima A., Wada K., Miki H., Kubota N. y col.**, 2001. Endogenous PPAR gamma mediates anti-inflammatory activity in murine ischemia-reperfusion injury. *Gastroenterology.* 120:460-9.
72. **Nielsen R., Grøntved L., Stunnenberg HG. y col.**, 2006. Peroxisome proliferator- activated receptor subtype-and cell-type-specific activation of genomic target genes upon adenoviral transgene delivery. *Molecular Cell Biology.* 26 (15):5698-5714.
73. **Pautz A., Art J., Hahn S. y col.**, 2010. Regulation of the expression of inducible nitric oxide synthase. *Nitric Oxide.* 15 (2):75-93.
74. **Pazienza V., Vinciguerra M., Mazzocchi G.**, 2012. PPARs Signaling and Cancer in the Gastrointestinal System. *PPAR Research.* Vol 2012, Article ID 560846.
75. **Penas F., Mirkin GA., Hovsepian E., Cevey A., y col.**, 2013. PPAR γ ligand treatment inhibits cardiac inflammatory mediators induced by infection with *Trypanosoma cruzi* strains of different lethality. *BBA Mol. Bas.* 1832 (1):239-248.
76. **Pinge-Filho P., Peron JP., de Moura TR. y col.**, 2005. Protective immunity against *Trypanosoma cruzi* provided by oral immunization with *Phytomonas serpens*: role of nitric oxide. *Immunol Lett.* 96 (2):283-290.
77. **Pinto AM., Sales PC., Camargos ER. y col.**, 2011. Tumour necrosis factor (TNF)-mediated NF- κ B activation facilitates cellular invasion of non-professional phagocytic epithelial cell lines by *Trypanosoma cruzi*. *Cell Microbiol.* 13 (10):1518-1529.
78. **Prata A.**, 2001. Clinical and epidemiological aspects of Chagas disease. *Lancet Infect Dis.* 1:92-100.
79. **Rassi A. Jr., Rassi A., Marin-Neto JA.**, 2010. Chagas disease. *The Lancet.* 9723:1388-1402
80. **Rassi A. Jr., Rassi A., Joffre Marcondes de Rezende**, 2012. American Trypanosomiasis (Chagas Disease). *Infectious Disease Clinics of North America.* 26 (2):275-291.
81. **Reilly CM., Oates JC., Cook JA. y col.**, 2000. Inhibition of mesangial cell nitric oxide in MRL/lpr mice by prostaglandin J2 and proliferator activation receptor-gamma agonists. *J Immunol.* 164 (3):1498-504.
82. **Reilly CM., Oates JC., Sudian J. y col.**, 2001. Prostaglandin J(2) inhibition of mesangial cell iNOS expression. *Clin Immunol.* 98:337-345.
83. **Reisenman CE., Lawrence G., Guerenstein PG. y col.**, 2010. Infection of kissing bugs with *Trypanosoma cruzi*. *Emerg Infect Dis.* 16, (3):400-405.
84. **Reyes PA., Vallejo M.**, 2005. Trypanocidal drugs for late stage, symptomatic Chagas disease (*Trypanosoma cruzi* infection). *Cochrane Database Syst Rev.* CD004102.
85. **Riarte A., Prado N., Hernandez Y. y col.**, 2013. Tratamiento con benznidazol en pacientes adultos con enfermedad de Chagas crónica. Un ensayo clínico aleatorizado en fase 3 denominado TRAENA.

Conferencia de apertura. XXVI Reunión Anual de la Sociedad Argentina de Protozoología. Ciudad de Rosario.

86. **Ribeiro AL., Nunes MP., Teixeira MM. y col.,** 2012. Diagnosis and management of Chagas disease and cardiomyopathy. *Nat. Rev. Cardiol.* 9:576-589.
87. **Ricote M., Li AC., Willson TM. y col.,** 1998. The peroxisome proliferator-activated receptor-gamma is a negative regulator of macrophage activation. *Nature.* 391:79-82.
88. **Saeftel M., Fleischer B., Hoerauf A.,** 2001. Stage-dependent role of nitric oxide in control of *Trypanosoma cruzi* infection. *Infect Immun.* 69 (4):2252-2259.
89. **Shamshiev AT., Ampenberger F., Ernst B., y col.,** 2007. Dyslipidemia inhibits Toll-like receptor-induced activation of CD8 α -negative dendritic cells and protective Th1 type immunity. *J Exp Med.* 204 (2) 441-452.
90. **Scher JU., Pillinger MH.,** 2009. The anti-inflammatory effects of prostaglandins. *J Investig Med.* 57:703-708.
91. **Souza PE., Rocha MO., Rocha-Vieira E. y col.,** 2004. Monocytes from patients with indeterminate and cardiac forms of Chagas' disease display distinct phenotypic and functional characteristics associated with morbidity. *Infect Immun.* 72:5283-5291.
92. **Su CG., Wen X., Bailey ST. y col.,** 1999. A novel therapy for colitis utilizing PPAR-gamma ligands to inhibit the epithelial inflammatory response. *J Clin Invest.* 104 (4):383-339.
93. **Subbaramaiah K., Lin DT., Hart JC. y col.,** 2001. Peroxisome proliferator-activated receptor gamma ligands suppress the transcriptional activation of cyclooxygenase-2. Evidence for involvement of activator protein-1 and CREB-binding protein/p300. *J Biol Chem.* 276:12440-12448.
94. **Talvani A., Rocha MO., Barcelos LS. y col.,** 2004. Elevated concentrations of CCL2 and tumor necrosis factor-alpha in chagasic cardiomyopathy. *Clin Infect Dis.* 38 (7):943-950.
95. **Tanowitz HB., Kirchoff LV., Simon D., y col.,** 1992. Chagas disease. *Clin Microbiol Rev.* 5 (4):400-419.
96. **Tanowitz HB., Machado FS., Jelicks LA. y col.,** 2009. Perspectives on *Trypanosoma cruzi*-induced heart disease (Chagas disease). *Prog Cardiovasc Dis.* 51:524-39.
97. **Tarleton RL.,** 1988. Tumour necrosis factor (cachectin) production during experimental Chagas disease. *Clin Exp Immunol.* 73 (2):186-190.
98. **Tarleton RL., Reithinger R., Urbina JA. y col.,** 2007. The challenges of Chagas Disease grim outlook or glimmer of hope. *PLoS Med.* 4:1852-1857.
99. **Teixeira M., Gazzinelli RT., Silva JS.,** 2002. Chemokines, inflammation and *Trypanosoma cruzi* infection. *Trends Parasitol.* 18:262-265.
100. **Tontonoz P., Nagy L., Alvarez JG. y col.,** 1998. PPARgamma promotes monocyte/macrophage differentiation and uptake of oxidized LDL. *Cell.* 93:241-252.
101. **Urbina JA.,** 2009. Ergosterol biosynthesis and drug development for Chagas disease. *Mem Inst Oswaldo Cruz.* 104 (1):311-318.
102. **Viotti R., Vigliano C., Lococo B., Alvarez MG. y col.,** 2009. Side effects of benznidazole as treatment in chronic Chagas disease: fears and realities. *Expert Rev Anti Infect Ther.* 7 (2):157-163.

103. **Wada K., Nakajima A., Blumberg RS. y col.**, 2001. PPAR γ and inflammatory bowel disease: a new therapeutic target for ulcerative colitis and Crohn's disease. *Trends Mol Med.* 7:329-331.
104. **Wang N., Verna L., Chen NG. y col.**, 2002. Constitutive activation of peroxisome proliferator-activated receptor- γ suppresses pro-inflammatory adhesion molecules in human vascular endothelial cells. *J Biol Chem.* 277:34176-34181.
105. **Waters JP., Pober JS., Bradley JR.**, 2013. Tumour necrosis factor and cancer. *J Pathol.* 230 (3):241-248.
106. **Yndestad A., Damás JK., Ore E. y col.**, 2007. Role of inflammation in the progression of heart failure. *Curr Cardiol Rep.* 9:236-241.
107. **Zingales B., Andrade SG., Briones MR. y col.**, 2009. A new consensus for *Trypanosoma cruzi* intraspecific nomenclature: second revision meeting recommends TcI to TcVI. *Mem. Inst Oswaldo Cruz.* 104:1051-1054.