

## Tesis Doctoral

# Estudio de los efectos antiinflamatorios de 15-deoxi-delta 12,14-prostaglandina J2 e IL-10 en miocardiocitos infectados con *Trypanosoma cruzi*. Mecanismos moleculares involucrados

Hovsepian, Eugenia

2012

Este documento forma parte de la colección de tesis doctorales y de maestría de la Biblioteca Central Dr. Luis Federico Leloir, disponible en [digital.bl.fcen.uba.ar](http://digital.bl.fcen.uba.ar). Su utilización debe ser acompañada por la cita bibliográfica con reconocimiento de la fuente.

This document is part of the doctoral theses collection of the Central Library Dr. Luis Federico Leloir, available in [digital.bl.fcen.uba.ar](http://digital.bl.fcen.uba.ar). It should be used accompanied by the corresponding citation acknowledging the source.

Cita tipo APA:

Hovsepian, Eugenia. (2012). Estudio de los efectos antiinflamatorios de 15-deoxi-delta 12,14-prostaglandina J2 e IL-10 en miocardiocitos infectados con *Trypanosoma cruzi*. Mecanismos moleculares involucrados. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires.

Cita tipo Chicago:

Hovsepian, Eugenia. "Estudio de los efectos antiinflamatorios de 15-deoxi-delta 12,14-prostaglandina J2 e IL-10 en miocardiocitos infectados con *Trypanosoma cruzi*. Mecanismos moleculares involucrados". Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires. 2012.

**EXACTAS** UBA

Facultad de Ciencias Exactas y Naturales



**UBA**

Universidad de Buenos Aires



UNIVERSIDAD DE BUENOS AIRES  
Facultad de Ciencias Exactas y Naturales

**Estudio de los efectos antiinflamatorios de  
15-deoxi-delta12,14-prostaglandina J2 e IL-10  
en miocardiocitos infectados con  
*Trypanosoma cruzi*. Mecanismos  
moleculares involucrados.**

Tesis presentada para optar al título de Doctor de la Universidad de  
Buenos Aires en el área Ciencias Biológicas

**Lic. Eugenia Hovsepian**

Director de Tesis: Dra. Nora Goren  
Consejero de Estudios: Dr. Eduardo Artz

Lugar de trabajo: Instituto de Microbiología y Parasitología Médica (IMPaM)-  
CONICET. Departamento de Microbiología, Parasitología e Inmunología,  
Facultad de Medicina, Universidad de Buenos Aires

Buenos Aires, 2012

**Estudio de los efectos antiinflamatorios de 15-deoxi- $\Delta^{12,14}$ -prostaglandina J2 e IL-10 en miocardiocitos infectados con *Trypanosoma cruzi*. Mecanismos moleculares involucrados.**

En la fase aguda de la enfermedad de Chagas, la infección por *T. cruzi* produce una intensa respuesta inflamatoria en diversos tejidos del organismo incluso en el corazón, donde los miocardiocitos constituyen un importante blanco. Si bien la reacción inflamatoria es importante para el control inicial de la infección, un desequilibrio o una mala resolución de la misma puede generar daños y alteraciones en la funcionalidad cardíaca.

Las células cardíacas responden a la infección mediante la expresión de enzimas inflamatorias como óxido nítrico sintasa 2 (NOS2) y metaloproteasas (MMPs) y citoquinas como TNF- $\alpha$  e IL-6. Esta respuesta está mediada por la activación de vías de señalización que incluyen al factor de transcripción nuclear- $\kappa$ B (NF- $\kappa$ B) y a las quinasas reguladas por señales extracelulares-proteínas quinasas activadas por mitógenos (ERK1/2-MAPK), cuya participación es fundamental en procesos inflamatorios.

Los receptores activados por factores de proliferación peroxisomal  $\gamma$  (PPAR $\gamma$ ) son factores de transcripción dependientes de ligando que han sido implicados en la regulación del metabolismo lipídico y de procesos inflamatorios.

En este trabajo evaluamos el aporte de 15-deoxi- $\Delta^{12,14}$ -prostaglandina J2 (15dPGJ2), ligando natural de PPAR $\gamma$  y de la citoquina antiinflamatoria IL-10 en la resolución de la respuesta inflamatoria en cultivos primarios de miocardiocitos neonatales de ratón infectados con la cepa letal pantrópica/reticulotrópica (RA) de *T. cruzi*.

Los resultados de esta evaluación evidencian que 15dPGJ2 es capaz de inhibir la expresión y actividad de diferentes enzimas inflamatorias como NOS2, MMP-9 y MMP-2, así como la expresión de las citoquinas proinflamatorias TNF- $\alpha$  e IL-6 inducidas por la infección.

Los efectos inhibitorios ejercidos por 15dPGJ2 involucran participación de mecanismos dependientes e independientes de PPAR $\gamma$ . La contribución de su receptor en los efectos ejercidos por 15dPGJ2 fue confirmada al silenciar la expresión mediante ARN de interferencia (siARN-PPAR $\gamma$ ). Por otro lado, a partir de la utilización de inhibidores

específicos de ERK1/2 y de NF- $\kappa$ B, demostramos que 15dPGJ2 también ejerce sus efectos de manera independiente a PPAR $\gamma$ , a través de estas vías.

IL-10 es una de las principales citoquinas antiinflamatorias y fue identificada originalmente como un factor inhibidor de la síntesis de citoquinas proinflamatorias y modulador de ciertas funciones asociadas a la activación de macrófagos y/o monocitos. En este trabajo se describe que la adición de IL-10 exógena inhibe la activación de las vías de señalización de ERK1/2 y de NF- $\kappa$ B y reduce los niveles de expresión y actividad de NOS2, MMP-9 y MMP-2, así como la expresión de TNF- $\alpha$  e IL-6 inducidas por la infección.

La señalización por IL-10 a través de su receptor promueve fosforilación de STAT3, el cual actúa como factor de transcripción induciendo la expresión de proteínas supresoras de la señalización por citoquinas-3 (SOCS-3). Tanto la infección con *T. cruzi* como IL-10 inducen fosforilación de STAT3 y la expresión del ARNm de SOCS-3. El silenciamiento de la expresión de esta proteína mediante ARN de interferencia (siARN-SOCS-3) pone en evidencia la participación de la vía STAT3/SOCS-3 en los efectos ejercidos por IL-10.

El conocimiento más profundo sobre el papel de ligandos de PPAR $\gamma$  y de IL-10 podría ser de gran utilidad para formular estrategias alternativas o coadyuvantes de la terapéutica clásica en la infección por *T. cruzi*.

**Palabras claves:** *Trypanosoma cruzi*, miocardiocitos, respuesta inflamatoria, PPAR $\gamma$ , 15-deoxi- $\Delta^{12,14}$ -prostaglandina J2, IL-10

**Study of the antiinflammatory effects of 15-deoxy- $\Delta^{12,14}$ -prostaglandin J2 and IL-10 in *Trypanosoma cruzi* infected cardiomyocytes. Molecular mechanisms involved.**

In the acute phase of Chagas disease, *T. cruzi* infection produces an intense inflammatory response in different tissues including the heart where cardiomyocytes are an important target. Although the inflammatory reaction is important for the initial control of the infection, an imbalance or poor resolution can generate damage and impaired cardiac function.

Cardiac cells respond to infection by the expression of inflammatory enzymes like nitric oxide synthase 2 (NOS2) and metalloproteases (MMPs) and cytokines such as TNF- $\alpha$  and IL-6. This response is mediated by the activation of nuclear factor- $\kappa$ B (NF- $\kappa$ B) and extracellular signal-regulated kinases-mitogen-activated protein kinase (ERK1/2-MAPK) pathways, whose participation is essential in inflammatory processes.

Peroxisome proliferator-activated receptors  $\gamma$  (PPAR $\gamma$ ) are ligand-dependent transcription factors that have been implicated in the regulation of lipid metabolism and inflammatory processes.

In this study we evaluated the contribution of 15-deoxy- $\Delta^{12,14}$ -prostaglandin J2 (15dPGJ2), natural PPAR $\gamma$  ligand, and the antiinflammatory cytokine IL-10 in primary cultures of neonatal mouse cardiomyocytes infected with the lethal pantropic/reticulotropic *T. cruzi* strain (RA).

The obtained results show that 15dPGJ2 is able to inhibit the expression and activity of different inflammatory enzymes such as NOS2, MMP-9 and MMP-2 as well as the proinflammatory cytokines TNF- $\alpha$  and IL-6 induced by *T. cruzi* infection.

15dPGJ2 antiinflammatory effects involve participation of PPAR $\gamma$ -dependent and -independent mechanisms. PPAR $\gamma$  contribution in 15dPGJ2 effects was confirmed by silencing PPAR $\gamma$  expression with small interfering RNA (PPAR $\gamma$ -siRNA). On the other hand, the use of specific ERK1/2 and NF- $\kappa$ B pharmacological inhibitors demonstrated that 15dPGJ2 can also exert its effects through these pathways.

IL-10 is one of the most important antiinflammatory cytokines and has been originally identified as a cytokine synthesis inhibitor factor and modulator of certain functions associated with macrophages and/or monocytes activation. This work describes that exogenous addition of IL-10 inhibits ERK1/2 and NF- $\kappa$ B activation and reduces NOS2, MMP-9 and MMP-2 expression and activities as well as TNF- $\alpha$  and IL-6 expression after *T. cruzi* infection.

IL-10 signaling through its receptor promotes STAT3 phosphorylation, which acts as a transcription factor inducing the expression of suppressor of cytokine signaling-3 (SOCS-3). Both *T. cruzi* infection and IL-10 treatment promote STAT3 phosphorylation and SOCS-3 mRNA expression. SOCS-3 silencing with small interfering RNA (SOCS-3-siRNA) reveals STAT3/SOCS-3 signaling participation in IL-10 effects.

A better understanding of the role exerted by PPAR $\gamma$  ligands and IL-10 could be useful in finding new or alternative strategies which could replace the classic parasitocidal therapeutic in *T. cruzi* infection.

**Key words:** *Trypanosoma cruzi*, cardiomyocytes, inflammatory response, PPAR $\gamma$ , 15-deoxy- $\Delta^{12,14}$ -prostaglandin J2, IL-10

*Estos años de gran esfuerzo, dedicación y crecimiento profesional fueron compartidos con muchas personas a las que quiero mencionar.*

*Los principales responsables de este enorme logro son mamá y papá, por enseñarme que la perseverancia es la clave del triunfo y por ser mi guía fundamental e indispensable.*

*Agradezco a la Dra. Nora Goren por haberme recibido en su laboratorio y por haber confiado en mí durante tantos años. Por las críticas constructivas, la paciencia y por enseñarme a mantener la calma sin dejar para mañana lo que se pueda hacer hoy. También quiero agradecer al Dr. Gerardo A. Mirkin por su enorme voluntad y generosidad, por instruirme en el manejo cuidadoso de los animales infectados y por haberme brindado su ayuda para el uso del microscopio de fluorescencia y para los análisis estadísticos.*

*A Hernán por ser mi compañía y por haber estado en los momentos más decisivos: el inicio y fin de mi Licenciatura y ahora en esta larga etapa hacia el Doctorado y sobre todo, por hacerme tan feliz. A Juli, Ro, Lucas, Santí, Fran y Die por ser la familia más linda que pude tener y también por ser en parte responsables de mis logros. A mis amigas/os les agradezco su más genuina presencia. Compartir la vida con ustedes me llena el alma de alegría.*

*Gracias a todo el "beculario" por los días de trabajo, de charlas absurdas, de mates eternos y sobre todo por los momentos divertidos que pasamos en estos años. A Fede, en especial por estar dispuesto a ayudarme cada vez que lo necesité.*

*A Maribel por su colaboración en la preparación de los medios y del material, a Eduardo y Ricardo por infectarme los animales, al bioterio del piso 13 especialmente a Sabrina, por su gran dedicación por los ratones. A*

*todos los investigadores y becarios del piso 13 por permitirme utilizar las instalaciones de cada laboratorio.*

*Agradezco también a la Dra. Marisa Gómez, por su gran predisposición y sus aportes tanto a nivel intelectual como material y al grupo de la Dra. María Elena Sales, por aceptarnos en sus seminarios de los viernes, por las opiniones y sugerencias que fueron siempre muy constructivas.*

*Por último agradezco al Dto. De Microbiología, Parasitología e Inmunología de la Facultad de Medicina de la Universidad de Buenos Aires y al nuevo Instituto de Microbiología y Parasitología Médicas (IMPaM) por haber sido el lugar en el que desarrollé mis actividades científico-académicas, al Centro de Estudios Farmacológicos y Botánicos (CEFyBO) por haberme dado la oportunidad inicial para el desarrollo de esta Tesis y al Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas (CONICET) por las becas otorgadas. Además, a los subsidios otorgados por la UBA, la Agencia Nacional de Ciencia y Tecnología y el CONICET que permitieron la realización de este trabajo.*

*Gracias!!!*



*A mi familia y amigos*

## Trabajos realizados durante este período de Tesis:

15-deoxy-Delta<sup>12,14</sup> prostaglandin J<sub>2</sub> but not rosiglitazone regulates metalloproteinase 9, NOS-2, and cyclooxygenase 2 expression and functions by peroxisome proliferator-activated receptor gamma-dependent and -independent mechanisms in cardiac cells.

**Hovsepian E**, Penas F, Goren NB.

Shock. 34:60-7, 2010.

Modulation of inflammatory response and parasitism by 15-deoxy-Δ(12,14) prostaglandin J<sub>2</sub> in *Trypanosoma cruzi*-infected cardiomyocytes.

**Hovsepian E**, Mirkin GA, Penas F, Manzano A, Bartrons R, Goren NB.

Int J Parasitol. 41:553-62, 2011.

Role of PPARs in *Trypanosoma cruzi* Infection: Implications for Chagas Disease Therapy.

**Hovsepian E**, Penas F, Mirkin GA, Goren NB.

PPAR Res. 2012:528435, 2012.

## Otros trabajos publicados durante este período:

Salmonella enterica serovar Enteritidis dam mutant induces low NOS-2 and COX-2 expression in macrophages via attenuation of MAPK and NF-kappaB pathways.

Cerquetti MC, **Hovsepian E**, Sarnacki SH, Goren NB.

Microbes Infect. 10:1431-9, 2008.

PPAR<sub>γ</sub> ligand treatment inhibits cardiac inflammatory mediators induced by infection with different lethality strains of *Trypanosoma cruzi*.

Penas F, Mirkin GA, **Hovsepian E**, Cevey A, Caccuri R, Sales ME, Goren NB.

Biochim Biophys Acta. 1832:239-248, 2013.

Macrophages derived from septic mice modulate nitric oxide synthase and angiogenic mediators in the heart.

de la Torre E, **Hovsepian E**, Penas F, Dmytrenko G, Castro ME, Goren N, Sales ME.

J Cell Physiol. doi: 10.1002/jcp.24320, 2013.

<b>AA</b>	Ácido araquidónico
<b>ADN</b>	Ácido desoxirribonucleico
<b>AEBSF</b>	4-(2-aminoetil)-benceno sulfonilo fluoruro clorhidrato
<b>AMPc</b>	Adenosín monofosfato cíclico
<b>AP-1</b>	Proteína activada tipo-1
<b>APP</b>	Proteínas de fase aguda
<b>ARN</b>	Ácido ribonucleico
<b>ARNm</b>	Ácido ribonucleico mensajero
<b>ATF-2</b>	Factor de transcripción activador-2
<b>BSA</b>	Albumina sérica bovina
<b>Ca<sup>2+</sup></b>	Ión calcio
<b>CaM</b>	Calmodulina
<b>cdk5</b>	Quinasa 5 dependiente de ciclina
<b>cDNA</b>	Ácido desoxirribonucleico complementario
<b>COX-2</b>	Ciclooxigenasa 2
<b>CREB</b>	Elemento de respuesta a AMPc
<b>DAF-FM</b>	4-amino-5-metilamino-2',7'-difluorofluoresceína
<b>DMEM</b>	<i>Dulbecco's Modified Eagle Medium</i>
<b>DMSO</b>	Dimetil sulfóxido
<b>dNTPs</b>	Desoxinucleótidos
<b>DTT</b>	Ditiotreitol
<b>ECL</b>	Quimiluminiscencia enzimática
<b>EDTA</b>	Ácido etilendiaminotetracético
<b>EGTA</b>	Ácido de etileno glicol tetraacético
<b>ERK</b>	Quinasa regulada por señales extracelulares
<b>FAD</b>	Flavín adenín dinucleótido
<b>FITC</b>	Isotiocianato de fluoresceína
<b>FMN</b>	Flavin mononucleótido
<b>FNa</b>	Fluoruro de sodio
<b>g</b>	Aceleración de la gravedad
<b>GIPL</b>	Glicoinositolfosfolípidos
<b>GMPc</b>	Monofosfato de guinidina cíclico
<b>GPI</b>	Glicosilfosfatidilinositol
<b>h</b>	Horas
<b>H<sub>2</sub>O<sub>2</sub></b>	Peróxido de hidrógeno

<b>H<sub>4</sub>B</b>	Tetrahidrobiopterina
<b>HRP</b>	Peroxidasa de rábano
<b>IFN</b>	Interferon
<b>IκB</b>	Inhibidor del factor NF-κB
<b>IKK</b>	Quinasa de IκB
<b>IL</b>	Interleuquina
<b>JNK</b>	Quinasas c-Jun N-terminal
<b>kDa</b>	Kilodalton
<b>KCl</b>	Cloruro de potasio
<b>LB</b>	Linfocitos B
<b>LPS</b>	Lipopolisacárido
<b>LT</b>	Linfocitos T
<b>M-199</b>	<i>Medium 199</i>
<b>MAPK</b>	Proteín quinasas activadas por mitógenos
<b>MEC</b>	Matriz extracelular
<b>MHC</b>	Complejo mayor de histocompatibilidad
<b>Min</b>	Minutos
<b>ml</b>	Mililitro
<b>mM</b>	Milimolar
<b>MMP</b>	Metaloproteasa de matriz
<b>NADPH</b>	Nicotinamida adenina dinucleótido fosfato
<b>NaNO<sub>2</sub></b>	Nitrito de sodio
<b>NaVO<sub>4</sub></b>	Vanadato de sodio
<b>NF-κB</b>	Factor nuclear κB
<b>nm</b>	Nanometro
<b>nM</b>	Nanomolar
<b>NO</b>	Óxido nítrico
<b>NO<sup>2-</sup></b>	Nitritos
<b>NO<sup>3-</sup></b>	Nitratos
<b>NOHA</b>	N <sup>W</sup> -hidroxi-L-arginina
<b>NOS</b>	Óxido nítrico sintasa
<b>O<sub>2</sub><sup>-</sup></b>	Anión Superóxido
<b>OGP</b>	<i>Octyl-beta-glucopyranoside</i>
<b>OMS</b>	Organización mundial de la salud
<b>ONOO<sup>-</sup></b>	Peroxinitrito

<b>PBS</b>	Tampón fosfato salino
<b>PCR</b>	Reacción en cadena de la polimerasa
<b>pg</b>	Picogramo
<b>PG</b>	Prostaglandina
<b>15dPGJ2</b>	15-deoxi- $\Delta^{12,14}$ -prostaglandina J2
<b>PK</b>	Proteína quinasa
<b>pM</b>	Picomolar
<b>PMSF</b>	Fluoruro de fenilmetilsulfonilo
<b>PPAR</b>	Receptor activado por factores de proliferación peroxisomal
<b>PPRE</b>	Elementos de respuesta a PPAR
<b>PVDF</b>	Polivinildenedifloride
<b>Q-RT-PCR</b>	RT-PCR cuantitativa y a tiempo real
<b>RT</b>	Retrotranscripción
<b>SD</b>	Desviación estandar
<b>SDS</b>	Dodecilsulfato sódico
<b>s</b>	Segundos
<b>SFB</b>	Suero fetal bovino
<b>SOCS</b>	Proteínas supresoras de la señalización por citoquinas
<b>Sp1</b>	Proteína de especificidad 1
<b>STAT</b>	Transductores de señal y activadores de la transcripción
<b>TGF-<math>\beta</math></b>	Factor de crecimiento transformante <i>beta</i>
<b>TIMP</b>	Inhibidores tisulares de metaloproteasas
<b>TLR</b>	Receptor tipo " <i>Toll</i> "
<b>TNF</b>	Factor de necrosis tumoral
<b>VCAM-1</b>	Molécula de adhesión de célula vascular 1
<b>Wb</b>	Western blot
<b><math>\mu\text{m}</math></b>	Micrómetro
<b><math>\mu\text{M}</math></b>	Micromolar
<b><math>\mu\text{g}</math></b>	Microgramo
<b><math>\mu\text{l}</math></b>	Microlitro
<b>Zn<sup>2+</sup></b>	Ión zinc

## INTRODUCCIÓN

1 Mal de Chagas-Mazza. Características generales	1
1.1 Ciclo de vida de <i>Trypanosoma cruzi</i>	1
1.2 Diversidad genética de <i>T. cruzi</i> . Caracterización de cepas	4
1.3 Vías de transmisión	6
1.4 Fases de la enfermedad de Chagas	7
1.5 Distribución geográfica y epidemiología	8
1.6 Tratamiento	10
2 Respuesta inflamatoria	11
2.1 Mediadores inflamatorios	13
2.1.1 Citoquinas proinflamatorias	13
2.1.2 Especies reactivas: Óxido nítrico	14
2.1.2.1 Óxido nítrico sintasas	16
2.1.2.2 Papel del NO en corazón	18
2.2 Metaloproteasas de la matriz (MMPs)	19
2.2.1 MMPs solubles: gelatinasas MMP-2 y MMP-9	21
2.2.2 Papel de MMPs en corazón	21
2.3 Vía de señalización de NF- $\kappa$ B	22
2.3.1 NF- $\kappa$ B en la respuesta inflamatoria	26
2.4 Vía de las MAPK	26
3 Resolución de la inflamación	29
3.1 PPARs	29
3.1.1 Mecanismos de acción de PPAR $\gamma$	32
3.1.2 15-deoxi- $\Delta^{12,14}$ -PGJ2 (15dPGJ2): Ligando natural de PPAR $\gamma$	33
3.2 Interleuquina 10 (IL-10)	37
3.2.1 Señalización por IL-10	37
3.2.1.1 SOCS-3 como regulador de la respuesta inflamatoria	40

## OBJETIVOS

1 Objetivo general	41
2 Objetivos específicos	41

## MATERIALES Y MÉTODOS

1 Reactivos	42
2 Ratones e infección con <i>T. cruzi</i>	43
2.1 Obtención de tripomastigotes	43

3 Cultivo primario de miocardiocitos neonatales de ratón	44
3.1 Inmunomarcación de miocardiocitos en cultivo	44
3.2 Tinción con azul tripán	45
3.3 Infección de miocardiocitos con tripomastigotes de <i>T. cruzi</i>	45
3.3.1 Inmunofluorescencia de miocardiocitos infectados	46
3.4 Determinación de nitritos/nitratos	46
4 RT-PCR cuantitativa y a tiempo real (Q-RT-PCR)	47
5 Determinación de la producción de IL-10	48
6 ARN de interferencia (siARN)	48
7 Preparación de extractos proteicos citosólicos, nucleares y totales	49
7.1 Cuantificación de proteínas	49
7.2 Análisis de proteínas por Western blot	49
8 Zimografía	50
9 Análisis estadísticos	51

## RESULTADOS

<b>PARTE1: Caracterización del modelo de infección de miocardiocitos con la cepa RA de <i>Trypanosoma cruzi</i>. Evaluación de la respuesta inflamatoria</b>	52
1 Obtención de los cultivos primarios de miocardiocitos e infección con <i>T. cruzi</i>	52
2 Parámetros inflamatorios inducidos por la infección aguda con <i>T. cruzi</i>	54
2.1 Expresión y actividad de la enzima proinflamatoria NOS2	54
2.2 Expresión y actividad de las metaloproteasas MMP-9 y MMP-2	56
2.3 Inducción de la expresión de citoquinas proinflamatorias	57
<b>PARTE 2: Efectos de 15dPGJ2 sobre miocardiocitos infectados con <i>T. cruzi</i></b>	59
1 Estudio del efecto modulador de 15-deoxi- $\Delta^{12,14}$ -prostaglandina J2 (15dPGJ2), ligando natural de PPAR $\gamma$ , sobre la respuesta inflamatoria	59
1.1 15dPGJ2 inhibe la síntesis y actividad de NOS2	59
1.2 Inhibición de la expresión y actividad de MMPs frente a la adición de 15dPGJ2	61
1.3 15dPGJ2 regula la síntesis de citoquinas inflamatorias	63
2 Modulación del parasitismo por 15dPGJ2	64
3 Mecanismos dependientes de PPAR $\gamma$ en los efectos ejercidos por 15dPGJ2	65
3.1 Participación de PPAR $\gamma$ en la inhibición de NOS2 por 15dPGJ2	67
3.2 15dPGJ2 modula el parasitismo de manera dependiente de PPAR $\gamma$	69

3.3 Mecanismos dependientes de PPAR $\gamma$ en la inhibición de MMPs por 15dPGJ2	70
4 Participación de mecanismos independientes de PPAR $\gamma$ en los efectos ejercidos por 15dPGJ2 en miocardiocitos infectados con <i>T. cruzi</i>	73
4.1 Inhibición de ERK1/2	73
4.2 Inhibición de NF- $\kappa$ B	75
<b>PARTE 3: Efectos de IL-10 frente a la infección con <i>T.cruzi</i></b>	79
1 IL-10 regula mediadores inflamatorios en miocardiocitos infectados con <i>T. cruzi</i>	79
1.1 Modulación de la expresión y actividad de NOS2 por IL-10	79
1.2 Efecto de IL-10 sobre la expresión y actividad de MMPs	82
1.3 IL-10 modula la expresión de TNF- $\alpha$ e IL-6	83
2 Vías de señalización involucrados en los efectos antiinflamatorios de IL-10 en células cardíacas infectadas con <i>T. cruzi</i>	84
2.1 IL-10 regula la activación de ERK1/2 y de NF- $\kappa$ B	85
2.2 STAT3 y SOCS-3 participan en los efectos antiinflamatorios ejercidos por IL-10	87
2.3 SOCS-3 está involucrado en los efectos antiinflamatorios ejercidos por IL-10	90
<b>DISCUSIÓN</b>	95
<b>CONCLUSIONES</b>	107
<b>BIBLIOGRAFÍA</b>	108



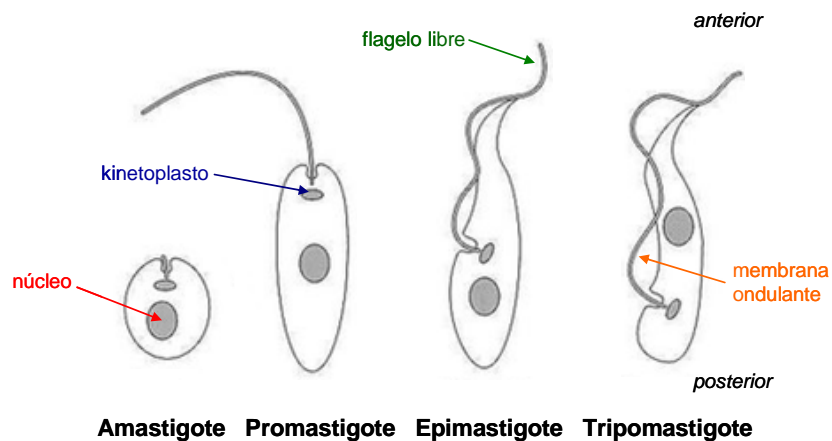
## **1 Mal de Chagas-Mazza. Características generales**

La enfermedad de Chagas, también conocida como tripanosomiasis americana, es una afección causada por la infección con el protozoo flagelado *Trypanosoma cruzi* (*T. cruzi*). La existencia de este parásito fue descubierta por el médico brasileño Carlos Chagas (1879-1934) quien en 1908 fue enviado por el Instituto Oswaldo Cruz para combatir una epidemia de malaria en la población de Lassance, estado de Minas Gerais. Durante su estadía, Chagas observó una peculiar infestación de las casas rurales por un insecto hematófago del subgénero *Triatoma*. Descubrió que los intestinos de estos insectos albergaban una nueva especie de protozoo flagelado del género *Trypanosoma*. Llamó a este nuevo parásito *Schizotrypanum cruzi*, en honor a Oswaldo Cruz (más tarde rebautizado *Trypanosoma cruzi*). Chagas logró describir el agente etiológico, la existencia de reservorios en animales, los vectores y los signos clínicos de una nueva enfermedad que posteriormente fue denominada enfermedad de Chagas en su honor (Chagas C. 1909, Chagas C. 1911). Años más tarde, el médico argentino Salvador Mazza redescubrió la enfermedad y entre 1934 y 1943 realizó un estudio detallado del mal dando a conocer los primeros diagnósticos de tripanosomiasis americana en Argentina (Mazza S. 1934, Mazza S. y col. 1936, Mazza S. 1943). Sus estudios epidemiológicos aumentaron el conocimiento acerca de los síntomas y las lesiones características de la infección.

### **1.1 Ciclo de vida de *Trypanosoma cruzi***

El ciclo de vida de *T. cruzi* es complejo ya que cuenta con varias etapas de desarrollo en diferentes hospedadores: intermediarios (vertebrados) y definitivos (insectos hemípteros hematófagos). En ambos tipos de hospedadores el parásito asume diferentes formas morfológicas sin afectar a los insectos vectores, aunque es capaz de causar daños importantes con altos grados de morbilidad y mortalidad en humanos. Se han descrito cuatro estadios básicos de desarrollo para *T. cruzi*: amastigote, promastigote, epimastigote y tripomastigote. Los mismos se han definido de acuerdo al hábitat y caracteres morfológicos y estructurales como la posición del kinetoplasto respecto del núcleo y la región donde se origina el flagelo (Katzin VJ. y col.1983).

Los amastigotes son formas redondeadas de 2 a 4  $\mu\text{m}$  de diámetro, que poseen un núcleo y un kinetoplasto del cual se forma el flagelo externo muy corto o inexistente. Estas formas se localizan en vacuolas acídicas del citoplasma de las células infectadas. Los promastigotes son estructuras alargadas de unos 18  $\mu\text{m}$  de longitud, con un núcleo central y un kinetoplasto en el extremo anterior que deja la formación de un flagelo incompleto o corto. Los epimastigotes tienen un mayor tamaño, entre 20 y 22  $\mu\text{m}$  de longitud. Poseen un flagelo libre que emerge de la región lateral anterior. El kinetoplasto del extremo anterior se encuentra desplazado al centro, prácticamente continuo al núcleo y es ahí donde se forma el flagelo quedando una parte en la porción anterior y formándose una pequeña membrana ondulante. Los tripomastigotes son las estructuras más alargadas (25 a 32  $\mu\text{m}$ ), tienen un núcleo central y el kinetoplasto se encuentra desplazado a la región terminal o subterminal. El flagelo sale del extremo posterior y se dobla hacia adelante a lo largo del cuerpo, formándose una membrana ondulante a lo largo de todo el parásito que emerge en forma libre en su extremo anterior (Fig. 1).



**Figura 1.** Formas celulares de *Trypanosoma cruzi*.

El parásito ingresa a la sangre del hombre y de otros mamíferos luego de ser picados por los insectos vectores. Inmediatamente después de succionar la sangre, el hematófago defeca liberando parásitos que se encuentran en el estadio de tripomastigotes metacíclicos en las heces. La lesión causada por el rascado de la picadura facilita el contacto de la herida con las heces contaminadas, favoreciendo la penetración del parásito a través de la piel (1 Fig. 2). En el sitio de inoculación puede

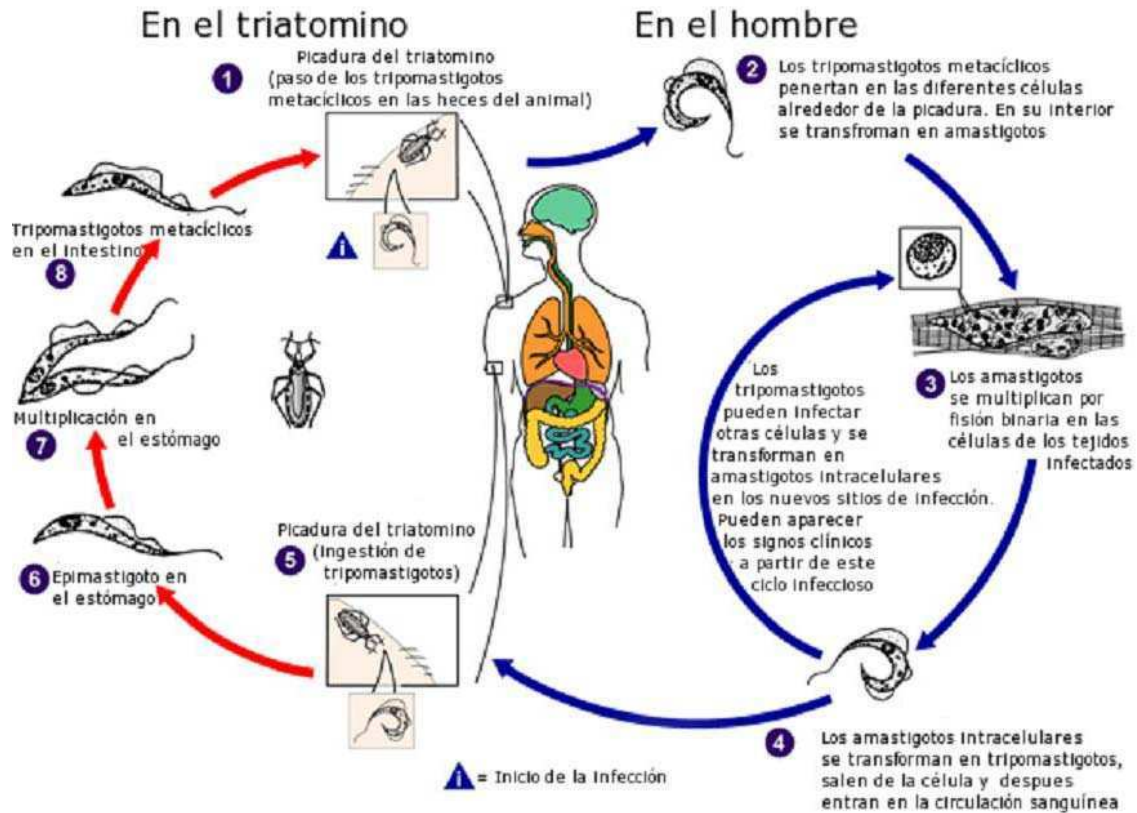
aparecer un nódulo cutáneo local llamado chagoma. La conjuntiva ocular es otra puerta de entrada frecuente en la infección por *T. cruzi* y puede desarrollarse edema palpebral unilateral, eritema, conjuntivitis y adenopatía satélite, conocido como signo de Romaña (Romaña C. 1963).

Una vez en el individuo, las formas metacíclicas invaden células cercanas a la puerta de entrada, siendo capaces de infectar prácticamente cualquier tipo celular al ser diseminados por circulación. Dentro de las células, se transforman en amastigotes (2 Fig. 2) y se replican intracelularmente por división binaria hasta sufrir una nueva transformación hacia tripomastigotes, los cuales causan lisis celular permitiendo su liberación hacia el torrente sanguíneo (3 y 4 Fig. 2). Los tripomastigotes liberados pueden infectar otras células pero carecen de capacidad de replicación ya que la única forma replicativa en los hospedadores es la forma amastigote intracelular. La infección del insecto se produce durante su ingesta, por succión de sangre que contiene tripomastigotes los cuales migran al intestino medio del vector (5 Fig. 2). Inicialmente, se diferencian a epimastigotes duplicativos para luego transformarse en tripomastigotes metacíclicos que se alojan en el recto de los insectos, comenzando un nuevo ciclo (7 y 8 Fig. 2). Este proceso de diferenciación de un estadio replicativo no-infectivo a uno no-replicativo infectivo en el huésped mamífero está ampliamente estudiado y es promovido por las condiciones del microambiente intestinal del vector (Fraidenraich D. y col. 1993, Isola EL. y col. 1986, Wainszelbaum MJ. y col. 2003).

La enfermedad de Chagas se transmite a los seres humanos y a más de 150 especies de animales domésticos (por ejemplo perros, gatos, cobayos y gallinas) y mamíferos silvestres (por ejemplo roedores, marsupiales y armadillos), principalmente por vectores reduvidos (Familia Reduviidae) de la subfamilia Triatominae, que no resultan afectados por la infección. Los vectores más importantes en la transmisión de *Trypanosoma cruzi* al hombre son *Triatoma infestans*, *Rhodnius prolixus* y *Triatoma dimidiata* (Zeledón R. y col. 1981). Históricamente, *T. infestans* ha sido el vector más importante para la transmisión de *T. cruzi* en sub-regiones endémicas del Amazonas. *R. prolixus* se encuentra en el norte de América del Sur y América Central y *T. dimidiata* ocupa un área similar, pero también se extiende hasta México.

Los triatominos son organismos hemimetábolos con cinco estadios ninfales previos al estado adulto, todos hematófagos estrictos con capacidad de albergar y transmitir

*T. cruzi*. La probabilidad de que un triatominos esté infectado con *T. cruzi* aumenta de acuerdo con el número de ingestas, de modo que los estadios ninfales más avanzados y los adultos tienden a tener las mayores tasas de infección.



**Figura 2.** Ciclo De vida de *T. cruzi*. Adaptado de [www.dpd.cdc.gov/dpdx/HTML/TrypanosomiasisAmericana.htm](http://www.dpd.cdc.gov/dpdx/HTML/TrypanosomiasisAmericana.htm)

### 1.2 Diversidad genética de *T. cruzi*. Caracterización de cepas.

*T. cruzi* presenta una estructura poblacional heterogénea compuesta por diferentes cepas o aislamientos que circulan entre los hospedadores mamíferos e insectos vectores. La clasificación taxonómica de este parásito según estudios morfológicos, biológicos, bioquímicos y genéticos lo ubica dentro del reino Protista, subreino Protozoa, phylum

Sarcomastigophora, clase Zoomastigophora, orden Kinetoplastida, familia Trypanosomatidae, género *Trypanosoma*, subgénero *Schizotrypanum*, especie *cruzi*.

Con el objeto de identificar, caracterizar y diferenciar los aislamientos de *T. cruzi*, se han empleado criterios moleculares mediante la utilización de métodos biológicos, bioquímicos y moleculares tales como perfiles electroforéticos, cariotipificación y “fingerprint” de ADN, entre otros. A partir de muestras de pacientes y animales infectados se observaron diferencias en la morfología del parásito (Brenner Z. 1973, González Cappa SM. y col. 1981a) y en parámetros tales como velocidad de replicación, tropismo tisular, expresión de antígenos en superficie y grado de virulencia (Andrade LO. y col. 1999, Dvorak JA. 1984, González Cappa SM. y col. 1981b, Tibayrenc M. y Ayala FJ. 1999). Por primera vez en 1999, un consenso internacional determinó la existencia de dos linajes completamente diferentes denominados *T. cruzi* I y *T. cruzi* II (Tc I y Tc II). Con el desarrollo de nuevos marcadores moleculares, se propuso dividir a *T. cruzi* en 6 Unidades de Tipificación Discretas (UTD), donde se mantuvo el linaje Tc I original, pero el Tc II se subdividió en 5 UTD (Tc IIa-e) (Brisse S. y col. 2000). Más aún, en el año 2006 se reportó la existencia del linaje III (de Freitas JM. y col. 2006). Sin embargo, dada la gran variabilidad fenotípica y genotípica de este parásito y teniendo en cuenta los estudios filogenéticos, en el consenso de Río de Janeiro 2009 se propuso que la subdivisión propuesta para el linaje Tc II debería ser modificada (Tc II-VI) (Zingales B. y col. 2009). Por otro lado, estudios de marcadores moleculares han demostrado recientemente la existencia de variabilidad genética también en Tc I (Cura Cl. y col. 2010, Falla A. y col. 2009, Herrera C. y col. 2009) diferenciándose cinco genotipos diferentes (Tabla 1, Cura Cl. y col. 2010).

Consenso 1999 (*)	Brisse S. y col. 2000	Consenso 2009 (**)	Cura Cl. y col. 2010
Tc I	Tc I	Tc I	Tc Ia Tc Ib Tc Ic Tc Id Tc Ie
Tc II	Tc IIa Tc IIb Tc IIc Tc IId Tc IIe	Tc IV Tc II Tc III Tc V Tc VI	Tc IV Tc II Tc III Tc V Tc VI

**Tabla 1.** Nomenclaturas propuestas para las diferentes unidades de tipificación discretas (UTDs) de *Trypanosoma cruzi* (Tc).

\* Recommendations from a Satellite Meeting International Symposium to commemorate the 90th anniversary of the discovery of Chagas disease. 1999. Mem Inst Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro, Vol. 94, Suppl. I: 429-432.

\*\* Zingales B. y col. 2009.

Se cree que la heterogeneidad de *T. cruzi* podría explicar la variedad en las manifestaciones clínicas que presenta la enfermedad del Chagas, como así también revelar las diferencias geográficas de mortalidad y morbilidad. Sin embargo, no existe una correlación definida entre el desarrollo de la enfermedad y la cepa del parásito (Tanowitz HB. y col. 2009).

### 1.3 Vías de transmisión

La enfermedad de Chagas es principalmente una enfermedad de transmisión vectorial, aunque también existen modos alternativos de transmisión de *T. cruzi*:

**a) Transmisión connatal.** La infección congénita ocurre en aproximadamente el 3% de los embarazos de mujeres con infección crónica en los países endémicos (Russomando G. y col. 1998, Torrico F. y col. 2004).

**b) Transmisión por transfusión sanguínea o transplante.** El riesgo de adquisición de la enfermedad de Chagas por transfusión sanguínea de un donante infectado representa un 10-20% de los casos y depende de varios factores como la concentración de parásitos en la sangre del donante, el componente de la sangre transfundida y la cepa del parásito

(Bern C. y col. 2008, Schmunis GA. 1999). Las infecciones de origen congénito y transfusional son las principales vías responsables de la urbanización de la enfermedad de Chagas y de su aparición en países no endémicos.

**c) Transmisión oral.** Su contagio es a través de jugos o carnes mal cocidas de animales silvestres infectados, presentando “brotes” en zonas endémicas. Si bien no es muy importante desde el punto de vista epidemiológico, es una vía que debe tenerse en cuenta (Yoshida N. y col. 2011).

**d) Transmisión por contaminación accidental en laboratorios.**

Dado que la transmisión vectorial históricamente ha sido la de mayor relevancia epidemiológica, los programas de control aplicados han disminuido este mecanismo de transmisión. El contagio por vía transfusional también ha disminuido considerablemente por los controles serológicos realizados en los bancos de sangre. Sin embargo, la transmisión vertical aún no puede ser prevenida ya que la droga disponible actualmente para el tratamiento específico de la enfermedad de Chagas (Benznidazol) no es aconsejada en el embarazo y es controvertida su aplicación en mujeres en edad reproductiva. Es por ello que esta forma de transmisión se plantea como una fuente continua de nuevos casos en hijos de madres chagásicas, lo cual representa claramente un problema de salud pública, aún en áreas bajo vigilancia epidemiológica. Las otras vías de transmisión, si bien no son importantes desde el punto de vista epidemiológico, dentro del contexto de país endémico deben tenerse presentes, pues pueden ser rápidamente diagnosticadas y tratadas.

#### **1.4 Fases de la enfermedad de Chagas**

El curso clínico de la enfermedad de Chagas presenta dos fases: aguda y crónica. La fase aguda suele ser de duración breve (4 a 8 semanas). Se caracteriza tanto por evidencias de parasitemia como de parasitismo en una amplia variedad de células del hospedador, lo que permite realizar el diagnóstico de la infección por métodos directos. En algunos individuos infectados se manifiesta como un síndrome febril con síntomas de malestar general, anorexia, náuseas, vómitos o diarrea. En los sitios de inoculación cutánea puede desarrollarse una lesión primaria denominada chagoma, caracterizada por un proceso inflamatorio agudo que produce una induración dolorosa y eritematosa

acompañado por inflamación de ganglios linfáticos satélites. Los casos más graves se reportan en niños que presentan hepatoesplenomegalia, linfadenopatía y edema. Las muertes causadas por la enfermedad de Chagas aguda se observan en menos del 10% de los casos sintomáticos y son atribuibles a complicaciones más graves como miocarditis, neumonía y encefalitis (WHO 2005). Aproximadamente el 60-70% de los pacientes que sobreviven a la fase aguda permanecen en un estado asintomático durante la fase crónica de la infección, evidenciado solo por serología positiva y hasta pueden permanecer sin síntomas durante toda la vida (Rassi A Jr. y col. 2010).

El restante 30-40% de los pacientes desarrollan una forma de enfermedad de Chagas crónica sintomática que se caracteriza por la progresión de la enfermedad cardíaca, gastrointestinal o neurológica durante un período que puede durar 10 a 20 años, siendo la miocardiopatía la manifestación más grave y común (Rassi A Jr. y col. 2007). Los primeros síntomas de la afección cardíaca comprenden anormalidades en el sistema de conducción, particularmente por bloqueo completo de la rama derecha o hemibloqueo de la rama anterior izquierda del haz de His (Blum JA. y col. 2008). A medida que la enfermedad progresa, los pacientes desarrollan arritmias auriculares y ventriculares, disfunción ventricular izquierda, eventos tromboembólicos, miocardiopatía dilatada e insuficiencia cardíaca congestiva. En consecuencia, pueden manifestarse palpitaciones, síncope y dolor torácico atípico, con un alto riesgo de muerte (Bern C. y col 2007, Prata A. 2001).

Las alteraciones descritas 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).

### **1.5 Distribución geográfica y epidemiología**

En la década del '30 la enfermedad de Chagas estaba íntimamente asociada a factores climáticos y socioeconómicos, los cuales favorecen la instalación del insecto en la vivienda humana o en el peridomicilio. Además, el 70% de los latinoamericanos vivía en zonas rurales donde la localización del parásito coincide con la presencia de triatominios.



Sin embargo, como consecuencia del aumento de emigraciones de los países endémicos de Latinoamérica hacia Estados Unidos, Canadá y Europa, sumado a que *T. cruzi* también se transmite por vía connatal, transfucional o por trasplante de órganos, se ha identificado un número creciente de personas infectadas en países no endémicos (Fig. 3). Actualmente, la enfermedad de Chagas posee una distribución geográfica que excede a la tradicionalmente descrita y fue reconocida como una de las trece enfermedades tropicales más desatendidas del mundo y que mayores cargas económicas provoca debido a la cronicidad a la que conlleva (Hotez PJ. y col. 2007). Según datos de la OMS, en el año 2008 la enfermedad de Chagas causó la muerte de más de 10.000 personas. Actualmente, se estima que 10 millones de individuos están infectados con *T. cruzi* en América (principalmente América Latina), mientras que más de 75 millones están en riesgo de contraer la enfermedad ([who.int/mediacentre/factsheets/fs340/en/](http://who.int/mediacentre/factsheets/fs340/en/)).



**Figura 3.** Número estimado de inmigrantes infectados con *T. cruzi* en países no-endémicos. Adaptado de Rassi A Jr. y col. 2010.

## 1.6 Tratamiento

Actualmente los fármacos de elección para el tratamiento de la enfermedad de Chagas son el 5-nitrofurano (Nifurtimox, Lampit® Bayer), sintetizado en 1952, y el derivado de 2-nitroimidazole (Benznidazol), sintetizado en 1968.

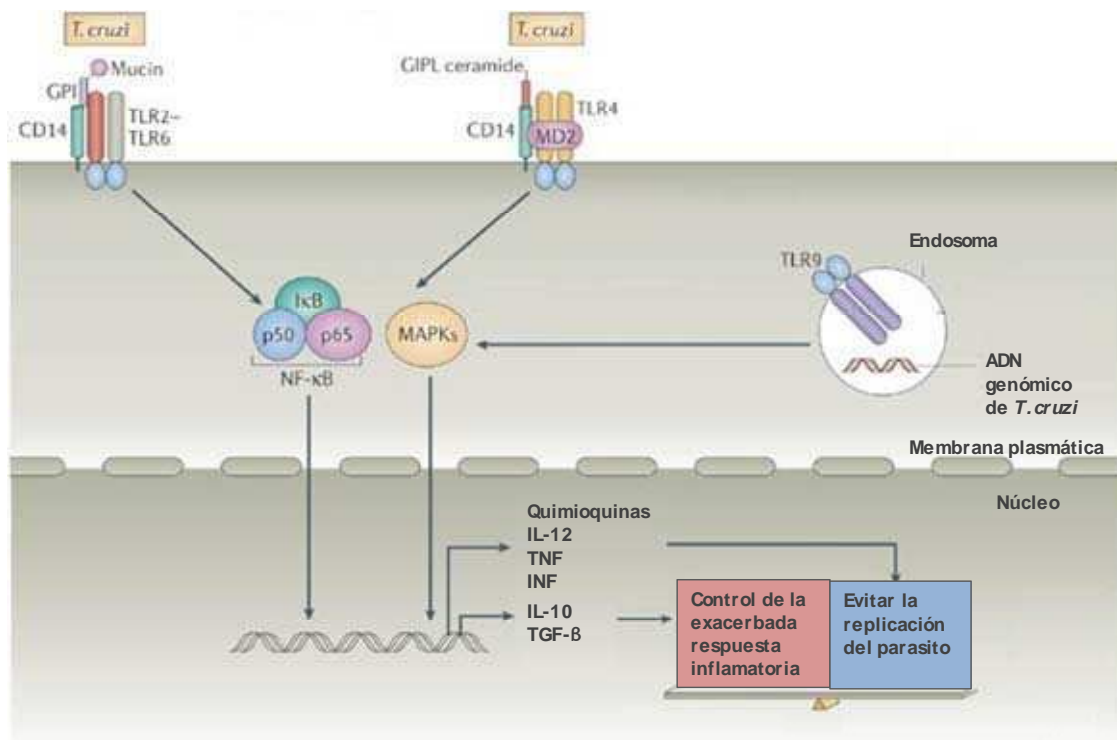
El tratamiento antiparasitario está indicado para todos los casos de enfermedad aguda, congénita y reactivada. La decisión de tratar a los pacientes con Chagas crónico todavía sigue siendo algo controversial (Reyes PA. y Vallejo M. 2005, [cdc.gov/chagas/health\\_professionals/tx.html](http://cdc.gov/chagas/health_professionals/tx.html)). En todos los casos 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. Las complicaciones más graves son agranulocitosis, fiebre y septicemia. Otras manifestaciones de intolerancia o hipersensibilidad podrían evitarse con la reducción de la dosis o suspensión del fármaco.

La última partida de Benznidazol se sintetizó en el año 2003 (Radanil, Roche). La organización humanitaria Médicos Sin Fronteras alertó sobre la falta del medicamento y que la situación de los enfermos, los cuales se calcula que suman 12 millones de personas en el mundo, era desesperante. Gracias a un reciente acuerdo entre dos laboratorios farmacéuticos locales (Maprimed y Elea), la Fundación Mundo Sano y el Ministerio de Salud de la Nación, Argentina se convertirá en el único productor del fármaco en el mundo.

## 2 Respuesta inflamatoria

En la fase aguda de la enfermedad de Chagas se produce una respuesta inflamatoria generalizada en los diferentes tejidos infectados, siendo esta inflamación necesaria para eliminar al parásito. Las células del sistema inmune innato reconocen componentes de *T. cruzi* como glicosilfosfatidilinositol (GPI) anclado a glicoproteínas tipo-mucina y glicoinositolfosfolípidos (GIPLs) a través de receptores tipo Toll (TLRs) TLR2/TLR6 y TLR4, respectivamente (Campos MA. y Gazzinelli RT. 2004). Asimismo, ha sido descrito que el genoma de *T. cruzi* contiene suficientes islas con motivos ricos en CpG (pares de citosina y guanina enlazados por fosfatos) como para inducir activación de las células infectadas también a través de la señalización por TLR9 (Bafica A. y col. 2006). Además, recientemente se han aportado evidencias acerca de la participación de TLR7 en el reconocimiento de ARN de *T. cruzi* y su papel determinante en la inducción de la respuesta inmune innata (Caetano BC. y col. 2011).

Una vez establecido en el citoplasma de los macrófagos, *T. cruzi* libera proteínas pertenecientes a una gran familia de trans-sialidasas que luego de ser procesadas, se localizan en la membrana de la célula hospedadora junto a moléculas del complejo mayor de histocompatibilidad tipo I (MHC I). De esta manera, pueden ser reconocidas por otras células del sistema inmune para alertar sobre la presencia del parásito en el organismo (Tarleton RL. 2007). Al activarse, las células inducen expresión de citoquinas y enzimas proinflamatorias, entre ellas la óxido nítrico (NO) sintasa inducible (iNOS o NOS2), cuyo producto es importante para la eliminación del parásito y para proporcionar las señales inflamatorias necesarias de la respuesta inmune adaptativa (Teixeira MM. y col. 2002). Sin embargo, la producción de este mediador inflamatorio en exceso también produce daños en diversos tejidos (Gutierrez FR. y col. 2009a). También ha sido descrito que el reconocimiento de GPI anclado a glicoproteínas tipo-mucina y de GIPLs de *T. cruzi* es un potente inductor de la respuesta inmune (Camargo MM. y col. 1997, Ropert C. y Gazzinelli RT. 2000). Por otro lado, debido a que *T. cruzi* es un protozoo intracelular que posee un repertorio antigénico extremadamente complejo, es difícil determinar el mecanismo exacto por el cual la gran diversidad de moléculas en su superficie celular son reconocidas por el sistema inmune innato (Buscaglia CA. y col. 2006).



**Figura 4.** Reconocimiento de *T. cruzi* por células hospedadoras. La mucina GPI de *T. cruzi* es ligando de los heterodímeros TLR2-TLR6. El complejo TLR4-MD2 reconoce glicoinositolfosfolípidos (GPIs) conteniendo ceramida. El TLR9, localizado en el retículo endoplasmático y endosomas, reconoce ADN de *T. cruzi*. La activación de los TLR dispara las vías de señalización de NF- $\kappa$ B y MAPK para inducir la expresión de citoquinas proinflamatorias que controlan directamente la replicación del parásito. Al mismo tiempo, se inducen genes que codifican para citoquinas antiinflamatorias. Un balance apropiado entre ambas respuestas define la persistencia de la infección. Adaptado de Gazzinelli RT. y Denkers EY. 2006.

Además, durante las primeras etapas de la infección se describe un incremento de la celularidad en el bazo y aumento en el número de células secretoras de anticuerpos en órganos linfoides secundarios. La falta o escasa efectividad de esta respuesta dan lugar a la replicación incontrolable del parásito, que puede llevar a la muerte del individuo infectado. Por otro lado, una respuesta inflamatoria excesiva también puede provocar importantes daños en los tejidos y conducir a la muerte (Golgher D. y Gazzinelli RT. 2004,

Teixeira MM. y col. 2002). Por lo tanto, resulta indispensable la existencia de un equilibrio fino entre el control de la replicación del parásito y la intensidad de la respuesta inflamatoria. En la mayoría de los individuos infectados este delicado equilibrio es alcanzado dando lugar a la infección crónica asintomática que puede durar toda la vida. Sin embargo, entre un 10% y un 40% desarrolla síntomas que involucran lesiones cardíacas o en el sistema nervioso o en el digestivo, siendo el compromiso cardíaco el aspecto clínico más destacado de la enfermedad de Chagas, debido a sus características, frecuencia y gravedad.

### **2.1 Mediadores inflamatorios**

Los mediadores de la inflamación son sustancias químicas inducidas localmente ante la presencia de distintos estímulos inflamatorios. Aunque la gran mayoría de ellos son producto de las células inflamatorias y de los sistemas enzimáticos del plasma que participan en la respuesta inflamatoria, algunos también pueden ser liberados por otros tejidos. Estas sustancias modulan una variedad de eventos inmunológicos y metabólicos y pueden tener efectos autocrinos, paracrinos o endocrinos. 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- $\alpha$ , IL-6 e IL-8 y e) Especies reactivas de oxígeno y nitrógeno: H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, O<sub>2</sub><sup>-</sup> y NO.

#### **2.1.1 Citoquinas proinflamatorias**

Las citoquinas son pequeños polipéptidos generados por las células del sistema inmune en respuesta a una infección o a una lesión tisular. La producción de estas moléculas está generalmente auto-limitada y aunque poseen corta vida media, algunas de ellas pueden persistir en la 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.

IL-1 $\beta$ , TNF- $\alpha$  e IL-6 median la inducción y modulación de la respuesta inflamatoria aguda local y sistémica con el fin de resolver el proceso infeccioso a través de la eliminación del agente causal. A tal fin, actúan sobre las diferentes poblaciones celulares cercanas al foco infeccioso, que en conjunto culminan en el reclutamiento de leucocitos al sitio de infección. IL-1 $\beta$  y TNF- $\alpha$  activan las células endoteliales y suministran señales de coestimulación y mitogénesis a linfocitos B y T (LB y LT). IL-6 estimula la secreción de inmunoglobulinas y la proliferación de los LB. Además, estas citoquinas proinflamatorias inducen la producción de proteínas de fase aguda como proteína C-reactiva,  $\alpha$ -1-antitripsina, ceruloplasmina, haptoglobina, fibrinógeno, proteína amiloide sérica, etc. por los hepatocitos y actúan sobre el hipotálamo induciendo fiebre.

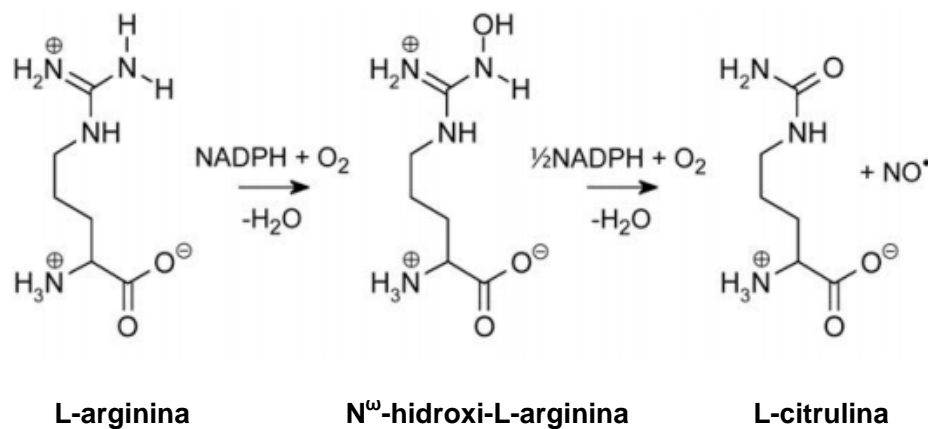
TNF- $\alpha$  es una de las citoquinas más estudiadas en la fisiopatología cardíaca ya que posee efectos directos sobre la contractilidad de los miocardiocitos y se ha demostrado que altera la homeóstasis del calcio (Ca<sup>2+</sup>) (Janczewski AM. y col. 2003). Además, se ha descrito que esta citoquina es producida por células endoteliales y por los propios miocardiocitos, en los que también se ha caracterizado la presencia de receptores de TNF- $\alpha$  tipo 1 (TNF-RI) y tipo 2 (TNF-RII) (Torre-Amione G. y col. 1995). Al igual que TNF- $\alpha$ , 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. 1999, Yndestad A. y col. 2007).

### **2.1.2 Especies reactivas: Óxido nítrico**

En el curso de la respuesta inflamatoria se producen una variedad de mediadores inflamatorios altamente citotóxicos como los intermediarios reactivos de oxígeno y del nitrógeno entre los que se encuentran el peróxido de hidrógeno (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>), el anión superóxido (O<sub>2</sub><sup>-</sup>), el óxido nítrico (NO) y el peroxinitrito (ONOO<sup>-</sup>).

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 ( $\text{NO}_2^-$ ) y nitratos ( $\text{NO}_3^-$ ). La biosíntesis de NO en el organismo es llevada a cabo por las óxido nítrico sintasas (NOS) a partir de L-arginina y oxígeno molecular utilizando NADPH como donador de electrones y como cofactores al grupo hemo, FMN, FAD y  $\text{H}_4\text{B}$ . Consiste en una reacción de oxidación que consume cinco electrones para generar NO y L-citrulina vía la formación de un intermediario  $\text{N}^{\omega}$ -hidroxi-L-arginina (NOHA) (Fig. 5) (Alderton WK. y col. 2001).



**Figura 5.** Síntesis de óxido nítrico (NO) a partir de L-arginina.

El NO sintetizado ingresa al citosol de células adyacentes al sitio de formación y activa a la guanilato ciclasa soluble. Esto promueve aumentos en los niveles de GMPc los cuales modulan la actividad de la proteína kinasa G (PKG) y fosfodiesterasas. El GMPc promueve el secuestro de calcio ( $\text{Ca}^{2+}$ ) en el retículo endoplásmico a través de canales de calcio tipo-L disminuyendo los niveles citoplasmáticos, dando lugar a la relajación del músculo liso y vasodilatación consecuente (Ignarro LJ. 1992). Bajo estas condiciones fisiológicas, el NO (concentraciones en los rangos pM o nM) también 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 ( $\mu\text{M}$  o  $\text{mM}$ ) puede interactuar con otras especies para generar intermediarios altamente oxidantes cuyos efectos pueden ser deletéreos para las células.

### 2.1.2.1 Óxido nítrico sintasas

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  $Ca^{2+}$  y calmodulina (CaM).

**NOS1 o nNOS** fue la primera isoforma en ser descrita (Bredt DS. y col. 1990) y se expresa constitutivamente en sistema nervioso central y periférico así como también en células como los miocardiocitos. Se trata de una enzima citosólica de 160 kDa que bajo condiciones fisiológicas del endotelio vascular produce cantidades mínimas de NO mediante pulsos cortos a partir de L-arginina en respuesta a los niveles de  $Ca^{2+}$ , NADPH y mediadores de vasodilatación tales como acetilcolina, bradiquinina o histamina (Danson EJ. y col. 2005).

**NOS3 o eNOS** es una enzima de 133 kDa que está presente en células endoteliales, plaquetas, cerebro y miocardio. En el miocardio, la expresión de NOS3 podría tener un efecto protector frente a situaciones de sepsis (Ichinose F. y col. 2007). En este sentido, ha sido demostrado en un modelo murino de sepsis polimicrobiana severa que ratones deficientes en NOS3 generan inflamación sistémica mayor, evaluada por la expresión de citoquinas inflamatorias en pulmón, hígado y corazón, en comparación con ratones salvajes (Bougaki M. y col. 2010).

**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  $Ca^{2+}$ /CaM (Mayer B. y Hemmens B. 1997). Esta enzima, en contraste con las otras dos isoenzimas, puede producir continuamente altas cantidades de NO en respuesta a diversas citoquinas (TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IFN- $\gamma$ ) u otros estímulos como la presencia de LPS (Nussler AK. y Billiar TR. 1993). Dentro de los tipos celulares que expresan NOS2 se incluyen hepatocitos, células endoteliales, monocitos, células mastoideas y células musculares lisas (Kleinert H. y col. 2004). Ha sido descrito en un modelo de sepsis que sólo los miocardiocitos fetales y los neonatales expresan NOS2 en respuesta a LPS,



mientras que en corazón adulto la expresión de ésta y otras enzimas proinflamatorias es exclusiva de las células residentes no miocíticas y del infiltrado inflamatorio (Cuenca J. y col. 2006).

Los genes de las 3 isoformas de NOS tienen una estructura muy similar, lo que sugiere un gen ancestral común. Todas poseen dos dominios estructurales: un dominio oxigenasa N-terminal que contiene los sitios de unión para el grupo hemo, H<sub>4</sub>B y L-arginina, y un dominio reductasa C-terminal que presenta los sitios de unión para CaM, NADPH, FAD y FMN (Alderton WK. y col. 2001). El sitio de unión a CaM es el que separa ambos dominios (Fig. 6). Ésta fue la primera proteína descrita capaz de interactuar con NOS y su unión es necesaria para la actividad enzimática de las tres isoformas ya que alinea ambos dominios permitiendo el flujo de electrones al sitio catalítico (Bredt DS. y Snyder SH. 1990). En el caso de NOS1 y NOS3, los cambios intracelulares en la concentración de Ca<sup>2+</sup> son los que regulan la unión de CaM. Sin embargo, en NOS2 dicha proteína permanece fuertemente unida independiente de las elevaciones de Ca<sup>2+</sup> (Gachhui R. y col. 1998). Es por esta razón que una vez inducida y activa NOS2, puede producir continuamente grandes cantidades de NO (µM) hasta que la enzima es degradada (MacMicking J. y col. 1997). 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.

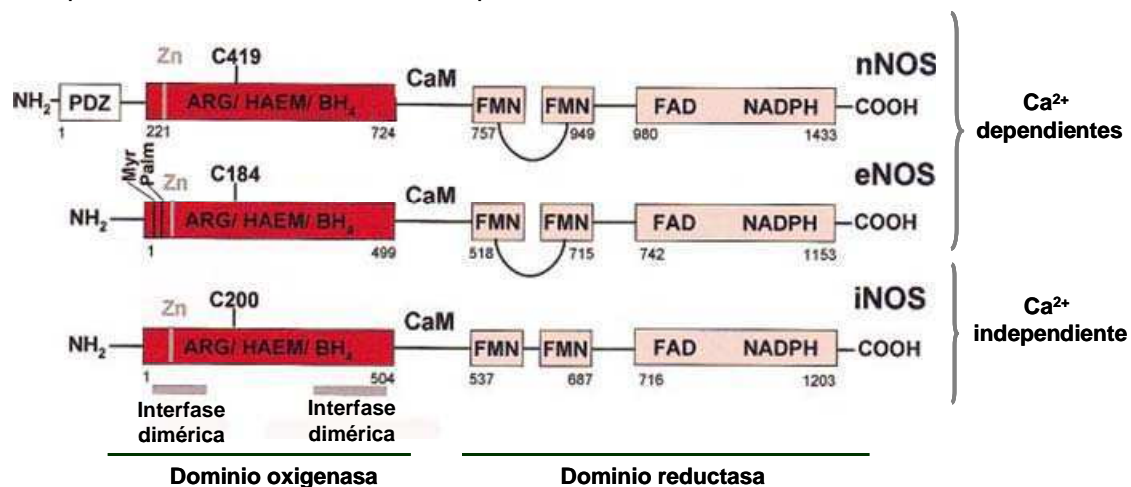


Figura 6. Esquema de las estructuras de las tres isoformas de NOS.

### 2.1.2.2 Papel del NO en el corazón

En los miocardiocitos y en el endotelio coronario, el NO cumple diversas funciones. A concentraciones fisiológicas, los niveles constitutivos de NO estimulan la vasodilatación coronaria y la angiogénesis, mientras que por otra parte inhiben la adhesión plaquetaria y la proliferación de células musculares lisas vasculares (VSMC). Además, modula el balance simpático-vagal, la función sistólica y diastólica, así como la apoptosis y la respiración mitocondrial (Belge C. y col. 2005, Massion PB. y col. 2003).

Algunas enfermedades cardíacas se caracterizan por cambios en la abundancia relativa de las NOS; mientras que NOS1 y NOS2 están sobre reguladas, la regulación de NOS3 está disminuida (Massion PB. y col. 2003). Dichas alteraciones en los niveles de NO están relacionadas con patologías cardiovasculares entre las que se incluyen hipertensión/hipotensión, hipercolesterolemia, arteriosclerosis y fallo cardíaco (Carnicer R. y col. 2012, Ziolo MT. y col. 2008). En contraposición con estos efectos, la sobreproducción de NO también puede resultar beneficiosa ya que actúa como microbicida, antiviral, antiparasitario y antitumoral (Benz D. y col. 2002, Vazquez-Torres A. y col. 2008).

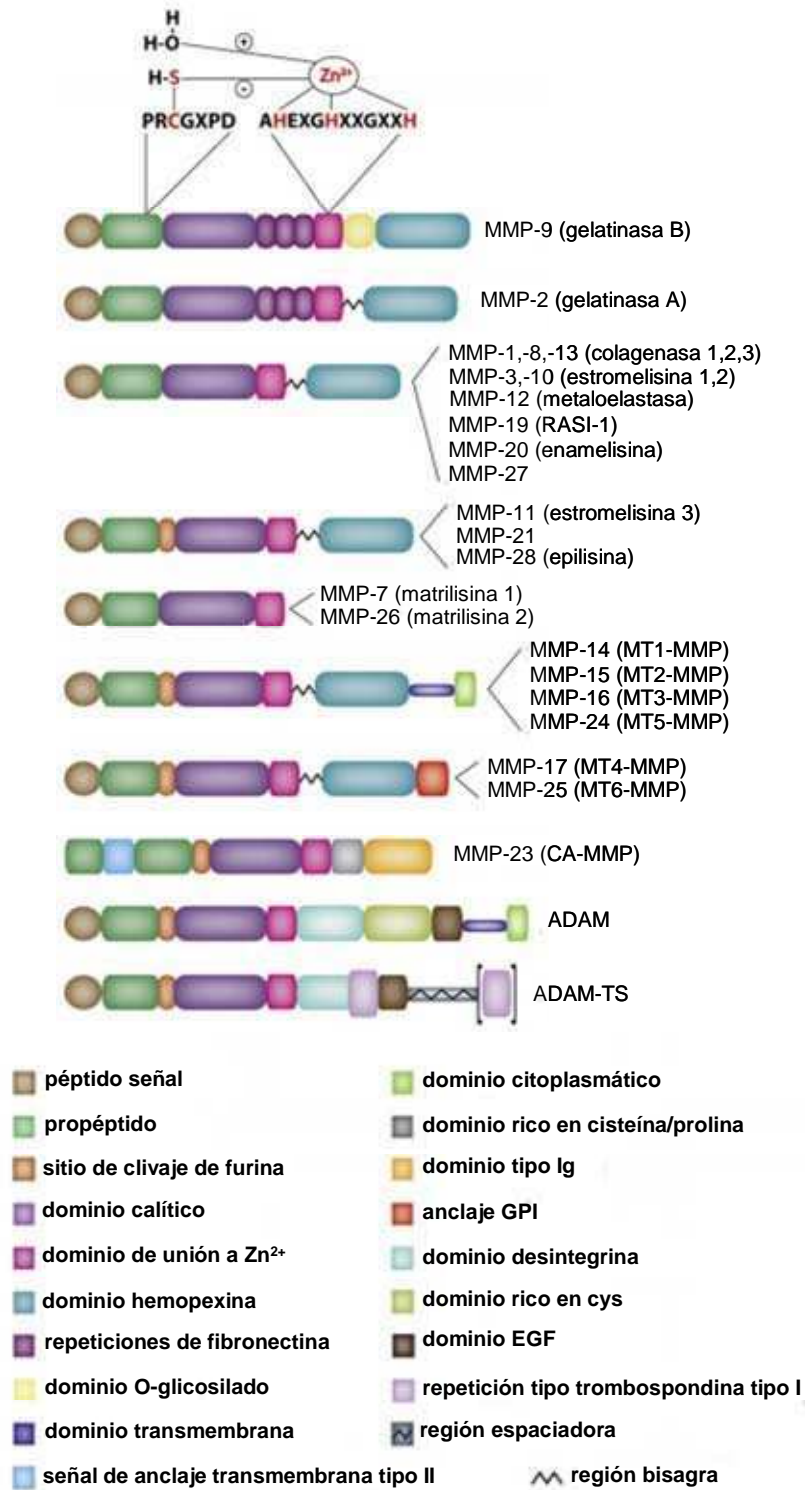
Ha sido descrito que en respuesta a la infección con *T. cruzi* los miocardiocitos liberan NO, citoquinas y quimioquinas proinflamatorias que son importantes para controlar la proliferación del parásito pero que también poseen efectos perjudiciales ya que contribuyen a la patogénesis de la miocardiopatía chagásica (Machado FS. y col. 2000, Gutierrez FR. y col. 2009b). Además, la activación de NOS2 inducida por la infección con *T. cruzi* promueve la expresión de citoquinas y quimioquinas las cuales representan señales críticas para el reclutamiento de células inflamatorias al corazón (Machado FS. y col. 2008). En un modelo murino de Chagas se observó que la pérdida de funcionalidad cardíaca se asocia a cambios en los niveles de  $Ca^{2+}$  intracelular, alteraciones en el contenido de la matriz extracelular y a la síntesis de marcadores de hipertrofia cardíaca. Esta perturbación de la homeostasis del calcio se debe, en parte, a la síntesis de NO proponiendo una relación entre los mediadores de la inflamación y la remodelación cardíaca durante la miocardiopatía chagásica (Roman-Campos D. y col. 2012). Por otro lado, ha sido reportado que los dadores de NO o el NO *per se* son capaces de controlar la infección ya que inhiben la actividad catalítica de cruzipaina, una cisteína proteasa de *T. cruzi*, importante para la invasión celular (Venturini G. y col. 2000). Se ha descrito que

ratones *knock out* para NOS2 infectados con *T. cruzi*, presentaron mayores tasas de parasitemia y mortalidad, incluso después de la infección con dosis muy bajas de tripomastigotes (Hölscher C. y col. 1998).

## 2.2 Metaloproteasas de la matriz (MMPs)

Las metaloproteasas de matriz (MMPs) son una familia de endopeptidasas dependientes de zinc, cuyo primer miembro fue descubierto en 1962 por Gross y Lapiere durante la búsqueda de una colagenasa endógena responsable de la morfogénesis de la cola de renacuajos en metamorfosis (Gross J. y Lapiere CM. 1962). Luego se describieron otras MMPs con capacidad para degradar diversas proteínas de la matriz extracelular (MEC) que participan en procesos fisiológicos como la angiogénesis y la embriogénesis (Roy R. y col. 2006, Vu TH. y Werb Z. 2000) y en procesos inflamatorios característicos de enfermedades como artritis, cáncer y aneurisma de la aorta (Deryugina EI. y Quigley JP. 2006, Mohammed FF. y col. 2003, Thompson M. y Cockerill G. 2006).

En base a su estructura primaria y especificidad por sustrato, las MMPs se clasificaron luego en colagenasas, gelatinasas, estromelinas y matrilisinas, MMPs de membrana y otras MMPs. Todas ellas se encuentran estructuralmente compuestas por un dominio NH<sub>2</sub>-terminal y un dominio catalítico que contiene un motivo de unión Zn<sup>2+</sup> conservado en el cual el ion Zn<sup>2+</sup> se encuentra unido a residuos de histidina en la secuencia AH<sub>6</sub>EXGHXXGXXH (Nagase H. y Woessner JF. 1999). Además, la mayoría de las MMPs posee varios dominios conservados, tales como el dominio hemopexina C-terminal (ausente en MMP-7, -23 y -26) importante para la unión de sustratos específicos, inhibidores endógenos y receptores de superficie celular (Piccard H. y col. 2007). En particular, las gelatinasas A y B (MMP-2 y MMP-9 respectivamente) tienen un dominio adicional tipo fibronectina implicado en la unión de colágenos desnaturalizados o gelatina, y la MMP-9 presenta además un dominio O-glicosilado. Existe también una familia de enzimas relacionadas con dominio desintegrina, denominada ADAM que comprende proteínas multifuncionales de membrana, similares a las metaloproteasas del veneno de serpientes. Las ADAM-TS son proteasas relacionadas con ADAM que contienen varias repeticiones de trombospondina tipo I en su región C-terminal, pero carecen del dominio transmembrana presente en ADAM (Fig. 7).



**Figura 7.** Representación esquemática de la estructura proteica de las MMPs, ADAMs y ADAM-TSs. Adaptado de Geurts N. y col. 2012.

### **2.2.1 MMPs solubles: gelatinasas MMP-2 y MMP-9**

La metaloproteasa 2 (MMP-2, gelatinasa A, colagenasa tipo IV) es una de las dos gelatinasas humanas descritas en la familia de MMPs, llamadas así por su capacidad para degradar proteolíticamente gelatina (colágeno desnaturalizado). MMP-2 se expresa de forma ubicua como una proenzima de 72 kDa que está sujeta a glicosilación. La activación de esta proenzima requiere del clivaje por MMP de membrana tipo 1 (MT1-MMP) generando un intermediario que luego madura en la forma activa de MMP-2 de 62 kDa (Deryugina E.I. y col. 2001). Además, la proenzima MMP-2 también puede ser activada por trombina y proteína C activada (Nguyen M. y col. 2000). Al activarse, MMP-2 facilita la migración de células permitiendo la infiltración de neutrófilos y linfocitos o la liberación de factores quimiotácticos (Nagase H. 1998).

La metaloproteasa 9 (MMP-9, gelatinasa B, colagenasa tipo IV) fue descubierta por primera vez en neutrófilos (Sopata I. y Danciewicz AM. 1974). MMP-9 se expresa como una proenzima de 92 kDa, que puede transformarse en una enzima activa de 83 kDa. Su actividad, así como la de otras MMPs, está regulada por diversos mecanismos de transcripción génica, secreción, activación, inhibición y glicosilación (Egeblad M. y Werb Z. 2002). Una vez activada, MMP-9 es capaz de procesar diversas biomoléculas incluyendo citoquinas, quimioquinas y hormonas, regulando así numerosas respuestas inmunes (Opdenakker G. y col. 2001, Van den Steen PE. y col. 2000).

### **2.2.2 Papel de MMPs en corazón**

En el miocardio, las MMPs se expresan principalmente en fibroblastos (Chapman RE. y col. 2003), células inflamatorias y miocardiocitos (Coker ML. y col. 1999, Cuenca J. y col. 2006, Hovsepian E. y col. 2010). Se ha descrito que estas enzimas participan activamente del remodelamiento de la MEC en diferentes patologías como aterosclerosis y fallo cardíaco induciendo cambios en la estructura, forma y función tisular (Creemers EE. y col. 2001, Galis ZS. y Khatri JJ. 2002). De hecho, la remodelación de la MEC por la acción de MMPs se considera uno de los componentes principales del daño cardíaco (Li YY. y col. 2000, Woodiwiss AJ. y col. 2001). Una de las razones por las que aumenta la actividad de las MMPs en el corazón dañado es la pérdida de la inhibición endógena por los TIMPs u otros inhibidores fisiológicos. La desregulación de este balance puede

producirse debido a diversos factores. Por ejemplo, ha sido descrito que las citoquinas inflamatorias IL-1 $\beta$ , IL-6 y TNF- $\alpha$  disminuyen la síntesis de colágeno, aumentan la expresión de MMPs y disminuyen la expresión de TIMPs en fibroblastos cardíacos (Li YY. y col. 1999, Siwik DA. y col. 2000).

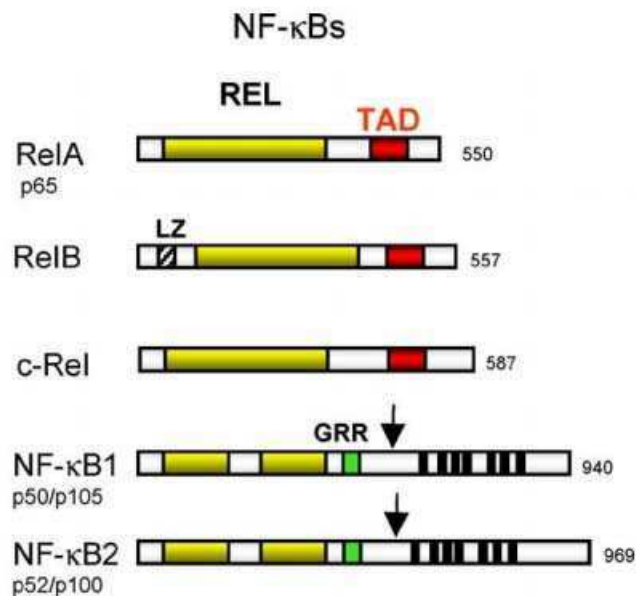
Además, se ha reportado que en situaciones de injuria cardíaca, las células inflamatorias atraviesan la matriz extracelular en un proceso que está orquestado por la producción y la actividad de MMPs (Tsuruda T. y col. 2004). La miocarditis chagásica se caracteriza por una fuerte reacción inflamatoria y presencia de infiltrados de LT y monocitos activados en el tejido cardíaco. En un modelo murino de infección con *T. cruzi* se ha relacionado de manera directa el aumento en la expresión y actividad de MMP-9 y MMP-2 con el infiltrado leucocitario y la mortalidad, ya que el tratamiento con un inhibidor de la expresión de ambas MMPs disminuyó la severidad de la miocarditis y aumentó la supervivencia de los ratones infectados (Gutierrez FR. y col. 2008). Por lo tanto, estas enzimas podrían contribuir a la miocarditis chagásica mediante remodelación de la MEC y ruptura de las membranas basales, favoreciendo la infiltración de células inmunes y aumentando la respuesta inflamatoria.

### 2.3 Vía de señalización de NF- $\kappa$ B

El factor de transcripción nuclear  $\kappa$  B (NF- $\kappa$ B) fue descrito por primera vez por Sen y Baltimore (Sen R. y Baltimore D. 1986). Pertenece a una familia muy conservada de factores de transcripción presentes en casi todos los tejidos y tipos celulares. NF- $\kappa$ B participa en numerosos procesos biológicos, incluyendo la respuesta inmune, inflamación, crecimiento celular, desarrollo y supervivencia (Hayden MS. y Ghosh S. 2008, Vallabhapurapu S. y Karin M. 2009). En mamíferos, la familia de NF- $\kappa$ B está compuesta por cinco miembros: RelA (también denominado p65), RelB, c-Rel, NF- $\kappa$ B1 p50 y NF- $\kappa$ B2 p52, los cuales forman varios complejos diméricos que transactivan numerosos genes blanco vía unión al potenciador (*enhancer*)  $\kappa$ B. Normalmente, las proteínas de NF- $\kappa$ B se encuentran secuestradas en el citosol por una familia de inhibidores denominada I $\kappa$ B, que incluye a I $\kappa$ B- $\alpha$  y a otras proteínas relacionadas como I $\kappa$ B $\beta$ , I $\kappa$ B $\epsilon$ , I $\kappa$ B $\zeta$  y Bcl-3. NF- $\kappa$ B1 p50 es generado mediante el procesamiento constitutivo de proteínas precursoras p105, mientras que p52 es producido a partir de p100 mediante eventos que involucran

fosforilación y ubiquitinación (Amir RE. y col. 2004). Las subunidades p50 y p52 son transcripcionalmente inactivas pero pueden inducir expresión génica cuando forman heterodímeros con RelA (p65) o c-Rel, siendo p50/p65 la forma más abundante y prototípica de NF- $\kappa$ B (Sacconi S. y col. 2003).

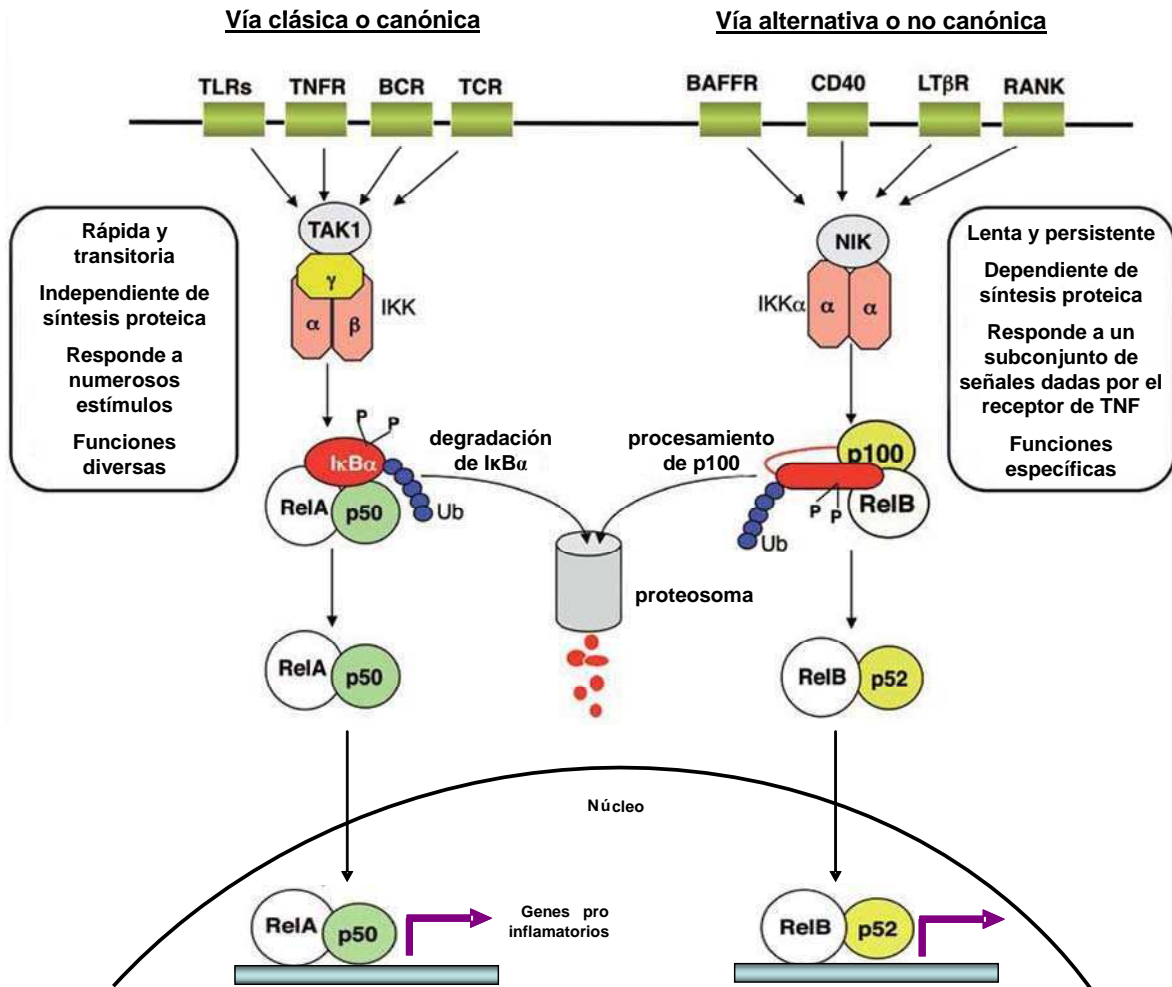
Los integrantes de la familia NF- $\kappa$ B se caracterizan por poseer un dominio homólogo REL muy conservado de 300 aminoácidos localizado en la región N-terminal, responsable de la dimerización, la interacción con I $\kappa$ Bs y la unión al DNA. RelA (p65), RelB y c-Rel contienen además en su región C-terminal dominios de transactivación (TAD) (Fig. 8). Estos dominios promueven transcripción de genes blanco ya que facilitan el reclutamiento de coactivadores y el desplazamiento de represores. La función de los dominios TAD es aumentada a través de modificaciones directas de NF- $\kappa$ B, como la fosforilación y representa otra cara de la regulación transcripcional mediada por NF- $\kappa$ B (Chen LF. y Greene WC. 2004). La activación génica más potente es la mediada por RelA o p65 ya que posee dos dominios de transactivación (Schmitz ML. y Baeuerle PA. 1991).



**Figura 8.** Los dominios REL se muestran en amarillo, los dominios de transactivación (TAD) se muestran en rojo. Se muestra también la región de cremallera de leucina (LZ) y la región rica en lisina (GRR). Las flechas indican las regiones de escisión de NF- $\kappa$ B1 y NF- $\kappa$ B2. El número de aminoácidos de cada proteína está indicado a la derecha. Adaptado de Serfling E. y col. 2004.

La señalización por NF- $\kappa$ B puede ocurrir a través de una vía clásica (canónica) o mediante una ruta alternativa (no canónica). La presencia de estímulos proinflamatorios, entre otros, induce activación de la vía clásica de NF- $\kappa$ B. El primer componente en activarse es el complejo trimérico I $\kappa$ B quinasa (IKK), de aproximadamente 700-900 kDa, que está formado por dos subunidades catalíticas IKK $\alpha$  e IKK $\beta$  y por otra subunidad reguladora, denominada IKK $\gamma$  (también llamada modulador esencial de NF- $\kappa$ B o NEMO). En primera instancia se activa IKK $\beta$ , quien fosforila a las proteínas inhibitorias I $\kappa$ B en dos residuos serina N-terminales (32 y 36) promoviendo la ubiquitinación y posterior degradación en el proteosoma. Cuando esto sucede, se liberan los dímeros RelA (p65)/p50 de NF- $\kappa$ B que translocan al núcleo promoviendo la activación de genes blanco. En la vía alternativa, el primer componente en activarse es la subunidad IKK $\alpha$  del complejo IKK. Esta fosforila a p100 quien es reconocido por la maquinaria de ubiquitin-ligasa. Una vez poliubiquitinado, p100 es procesado en el proteosoma, se liberan los dímeros RelB/p52 y son translocados al núcleo donde se unen a secuencias específicas en los promotores de los genes blanco (Fig. 9).





**Figura 9.** Vía clásica y alternativa de señalización por NF- $\kappa$ B. La vía clásica es activada por numerosos estímulos, entre ellos los mediados por receptores de la inmunidad innata y adaptativa. Esta vía involucra activación del complejo IKK por Tak1 (*TGF $\beta$  activating kinase1*). IKK activado es capaz de fosforilar al inhibidor I $\kappa$ B- $\alpha$ , resultando en su degradación proteosómica y en la traslocación nuclear del heterodímero RelA o p65/p50. La vía alternativa o no canónica, se activa por señales provenientes de un subconjunto de miembros de la familia del receptor de TNF, que inducen fosforilación y procesamiento de p100. Esta vía es dependiente de NIK e IKK $\alpha$  pero no del complejo trimérico IKK. Al activarse esta vía, media la activación persistente del complejo RelB/p52. Adaptado de Sun SC. 2011.

### **2.3.1 NF- $\kappa$ B en la respuesta inflamatoria**

El factor de transcripción NF- $\kappa$ B es un reconocido mediador central y pleiotrópico de la respuesta inmune. Su activación es inducida no sólo por antígenos de microorganismos de diversa naturaleza sino también por moléculas propias de la respuesta inflamatoria (Gloire G. y col. 2006). Al activarse, este factor de transcripción participa en el control de la expresión de más de 150 genes. Por ejemplo, aquellos que codifican para mediadores de la inmunidad innata como citoquinas, quimioquinas, moléculas de adhesión vascular y celular y enzimas específicas como NOS2, COX2, MMP-2 y MMP-9 y hasta se ha descrito que también regula la transcripción de micro-ARNs que participan en la respuesta inflamatoria (Boldin MP. y Baltimore D. 2012, Pahl HL. 1999). Además se ha reportado que NF- $\kappa$ B induce genes que promueven maduración y activación de células dendríticas y LT y B así como el desarrollo de órganos linfoides secundarios (Weih F. y Caamaño J. 2003).

La activación de NF- $\kappa$ B ha sido revelada como un evento crucial en diversas patologías que afectan al corazón, como insuficiencia cardíaca, hipertrofia de miocardio, miocardiopatía diabética y reperfusión isquémica (Gordon JW. y col. 2011, Lorenzo O. y col. 2011). Por ejemplo, en modelos murinos de injuria por isquemia y reperfusión se reportó que NF- $\kappa$ B desempeña un papel fundamental en la activación de genes de citoquinas y moléculas de adhesión implicados en el daño al miocardio (Morishita R. y col. 1997, Moss NC. y col 2007). Más aún, en ratones que no expresan la subunidad p50 de NF- $\kappa$ B se observó un mayor índice de sobrevida y una reducción de la dilatación del ventrículo izquierdo (Frantz S. y col. 2006). Sin embargo, se ha demostrado en modelos de isquemia preconditionada que NF- $\kappa$ B activa genes antiapoptóticos y media efectos proliferativos (Misra A. y col. 2003). Estos hallazgos contradictorios sobre el rol ejercido por NF- $\kappa$ B reflejan la alta complejidad de esta vía.

### **2.4 Vía de las MAPK**

En mamíferos, el término general MAPK comprende a una superfamilia de proteínas quinasas con especificidad serina/treonina-quinasa que actúan como punto de integración para múltiples señales bioquímicas. Estas quinasas están involucradas en la regulación de una amplia variedad de respuestas y procesos celulares como proliferación, diferenciación, desarrollo, apoptosis y regulación de la expresión génica. Además,

cumplen un importante papel en la activación de la respuesta inmune y pueden ser activadas por diversos tipos de estrés y citoquinas proinflamatorias.

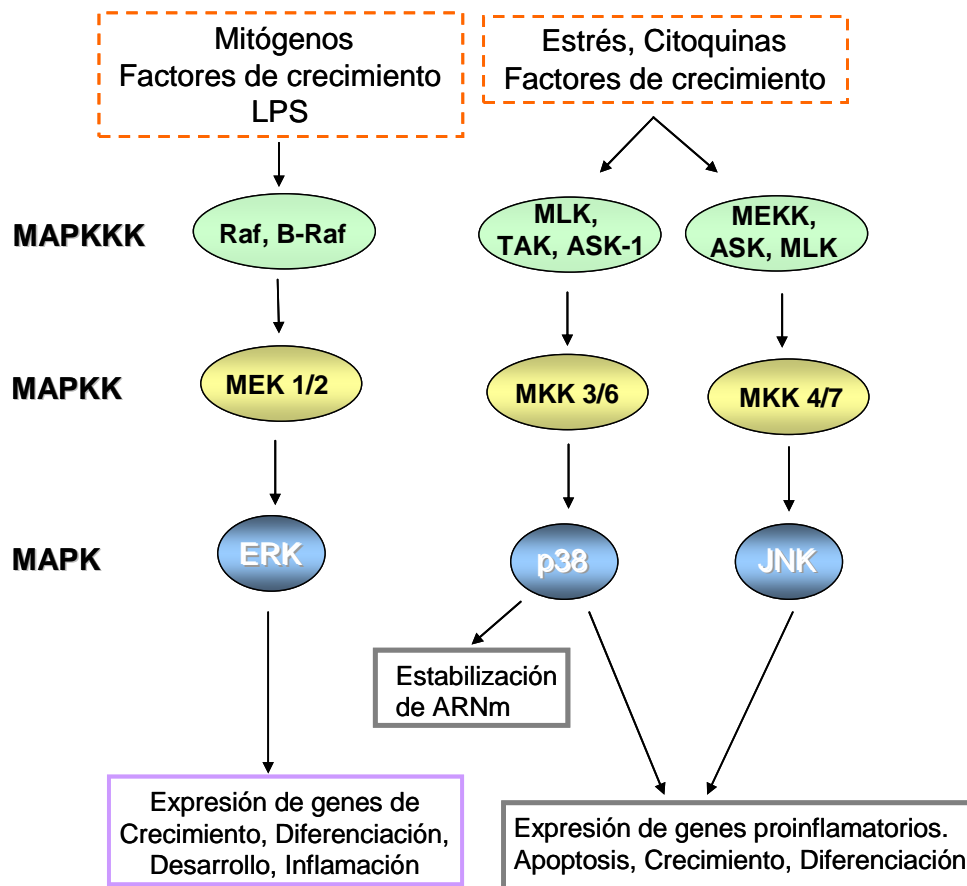
La familia MAPK consta de tres miembros principales: las quinasas reguladas por señales extracelulares p44 y p42 MAPK (ERK1/2), las proteínas c-Jun N-terminales o quinasas activadas por estrés (JNK o SAPK) y las proteínas p38-MAPK, las cuales representan tres vías separadas de señalización. Estas proteínas fueron identificadas a fines de los años '90 por Peter H Sugden y Angela Clerk como integrantes de vías de regulación potencialmente claves en la fisiopatología del miocardiocito (Sudgen H. y Clerk A. 1998 a,b).

La activación de cada subfamilia se produce en forma de cascada formada por tres módulos con actividad quinasa (MAPKKK, MAPKK y MAPK), donde los miembros del módulo superior fosforilan a los del inferior (Fig. 10). La especificidad de la respuesta de estas vías viene dada por la activación específica de los miembros de cada módulo (Pearson G. y col. 2001).

En la vía de señalización de ERK1/2, el primer componente en activarse es Raf-1 (una serina/treonina quinasa, MAPKKK) que integra la señal extracelular desde el complejo receptor/Ras (una pequeña proteína G) hacia una cascada de quinasas citosólicas por fosforilación y activación de MEK (MAPKK). Ésta, a su vez fosforila y activa, exclusivamente a ERK1/2 que finalmente regula varias proteínas citoplasmáticas (cdk5, proteínas del citoesqueleto) y nucleares (CREB, Elk-1) (Pouysségur J. y Lenormand P. 2003). En el núcleo, ERK1/2 también puede activar o fosforilar a algunos miembros de la familia de factores de transcripción de AP-1 y ATF-2 alterando la expresión de diversos genes (Gupta S. y col. 1996). Ha sido ampliamente descrito que esta vía se activa en respuesta a productos bacterianos como LPS, reconocidos por los TLRs, en monocitos y macrófagos (Cerquetti MC. y col. 2008, Geppert TD. y col. 1994, Marie C. y col. 1999, van der Bruggen T. y col. 1999). Además, se ha reportado que ERK1/2 participa de la respuesta a la injuria cardíaca por isquemia y reperfusión activando una serie de factores de transcripción que inducen a su vez la expresión de una gran cantidad de citoquinas proinflamatorias como IL-1 $\beta$  y TNF- $\alpha$  (Fang Y. y Hu J. 2011).

La vía de p38-MAPK es la primera en activarse en respuesta a citoquinas, mediadores inflamatorios y situaciones de estrés celular (Lang R. y col. 2006). Existen cuatro isoformas de p38: p38 $\alpha$ , p38 $\beta$ , p38 $\gamma$  y p38 $\delta$ . Todas ellas poseen perfiles de

activación similares, pero varían en identidad de secuencia. Esto les confiere especificidad de activación tanto en diferentes tejidos como condiciones fisiológicas, y requerimiento de distintas combinaciones de reguladores y coactivadores (Cook R. y col. 2007). Tanto es así que se han identificado más de doce sustratos para los distintos p38, incluyendo proteínas quinasas, factores de transcripción y otras proteínas. La fosforilación de estos sustratos es esencial para que las funciones biológicas de p38-MAPK, como regulación del ciclo celular, crecimiento, diferenciación, senescencia, tumorigénesis, apoptosis y diversos mecanismos de la respuesta inflamatoria puedan llevarse a cabo (Brancho D. y col. 2003). Además, p38-MAPK controla la estabilidad de los ARNm recién sintetizados, favoreciendo de esta manera la amplitud de la respuesta inflamatoria (Saklatvala J. y col. 2003).



**Figura 10.** Esquema de las vías de señalización de principales miembros de la familia de MAPK: ERK 1/2, JNK y p38.

### 3. Resolución de la inflamación

#### 3.1 PPARs

En el año 1990 se describió por primera vez que ciertas sustancias hepatocarcinógenas que promovían la proliferación de peroxisomas tenían a su vez efectos hipolipemiantes. Además de inducir la proliferación peroxisomal, estas sustancias promovían la transcripción de ciertos receptores, miembros de la superfamilia de receptores nucleares de hormonas esteroides y tiroideas. A estos nuevos receptores se los denominó receptores activados por factores de proliferación peroxisomal (PPARs) (Issemann I. y Green S. 1990).

Desde su descubrimiento, los PPARs han sido implicados en la regulación del metabolismo de la glucosa, lípidos y lipoproteínas (Lemberger T. y col. 1996, Mangelsdorf DJ. y col. 1995). Estudios posteriores han documentado que cumplen funciones muy diversas, ya que participan en la reparación tisular (Michalik L. y Wahli W. 2006), en distintos tipos de cánceres (Youssef J. y Badr M. 2011), en afecciones cardiovasculares como hipertensión y arterioesclerosis (Takano H. y Komuro I. 2009) y en procesos fisiológicos como mantenimiento del embarazo y desarrollo embrionario (Wieser F. y col. 2008). Además, se determinó que los ligandos de PPAR son capaces de regular el metabolismo lipídico durante la gestación en placentas de ratas diabéticas (Capobianco E. y col. 2008, Martínez N. y col. 2008). Más aún, numerosos estudios revelaron que también poseen un papel importante en la modulación de procesos inflamatorios e inmunidad, considerándolos reguladores cruciales de la expresión de genes proinflamatorios (Clark RB. 2002). La presencia de estos receptores se ha reportado en distintos tipos celulares como adipocitos, células dendríticas, monocitos, macrófagos, células endoteliales, células musculares lisas de la vasculatura y LT y B (Daynes NA. y Jones DC. 2002, Marx N. y col. 1998, Ricote M. y col. 1998). La expresión cardíaca de estos receptores ha sido reportada tanto en modelos *in vitro* como *in vivo* (Penas F. y col. 2012, Takano H. y col. 2000).

Se han identificado tres diferentes miembros de la familia PPAR, codificados por genes diferentes: PPAR $\alpha$  (NR1C1), PPAR $\beta$  (NR1C2), también denominado PPAR $\beta/\delta$ , y PPAR $\gamma$  (NR1C3) (N.R.N. Committee. 1999). Éstos se diferencian en su distribución tisular y especificidad de ligandos pero comparten la característica común de heterodimerización

con el receptor retinoide X (RXR) y modulación de la expresión de diferentes genes. La unión de los ligandos a estos receptores, que además son factores de transcripción, induce un cambio conformacional que promueve la liberación de co-represores y el reclutamiento de co-activadores, permitiendo la dimerización y unión a los elementos de respuesta de PPARs (PPREs) en los sitios promotores de genes diana.

### **PPAR $\alpha$**

Éste fue el primer miembro identificado en la familia PPAR. Su expresión es relativamente alta en hepatocitos, miocardiocitos, enterocitos, células musculares lisas y células renales. Además, se ha descrito que PPAR $\alpha$  se expresa en células inmunes humanas y de ratón incluyendo linfocitos, macrófagos y células dendríticas (Bookout AL. y col. 2006, Moreno S. y col. 2004, Pyper SR. y col. 2002). Ha sido demostrado en cultivos primarios de células de músculo liso aórtico que el tratamiento con fenofibratos y WY14643, ambos ligandos de PPAR $\alpha$ , inhibe la síntesis de la molécula de adhesión vascular 1 (VCAM-1) y la activación de NF- $\kappa$ B inducidas por TNF- $\alpha$  (Marx N. y col. 1999). Estudios recientes revelaron su participación en el control de la respuesta inflamatoria en modelos de alergia, artritis y enfermedad inflamatoria del intestino (Straus DS. y Glass CK. 2007). Por otro lado, diversos autores han investigado los mecanismos por los cuales PPAR $\alpha$  modula la respuesta inflamatoria y todos ellos demostraron que lo hace a través de la inhibición de la vía de NF- $\kappa$ B (Delerive P. y col. 1999, Marx N. y col. 1999, Poynter ME. y Daynes RA. 1998).

### **PPAR $\beta/\delta$**

PPAR $\beta$ , PPAR $\delta$  o PPAR $\beta/\delta$  se expresa de forma ubicua en muchos tejidos y a menudo a niveles más altos que otros PPAR, siendo su activación un requisito para el mantenimiento de la homeostasis energética. Este receptor también participa en la regulación de procesos inflamatorios, y ha sido demostrado que sus ligandos inhiben la expresión de la molécula de adhesión vascular VCAM-1, de la proteína quimioatrayente de monocitos MCP-1 así como la translocación nuclear de NF- $\kappa$ B, inducidas por TNF- $\alpha$  en cultivos de células endoteliales (Rival Y. y col. 2002). También se describió que PPAR $\beta/\delta$  controla la inflamación a través de su asociación y disociación a moléculas represoras de la transcripción en un modelo de aterosclerosis (Lee CH. y col. 2003). David Bishop-

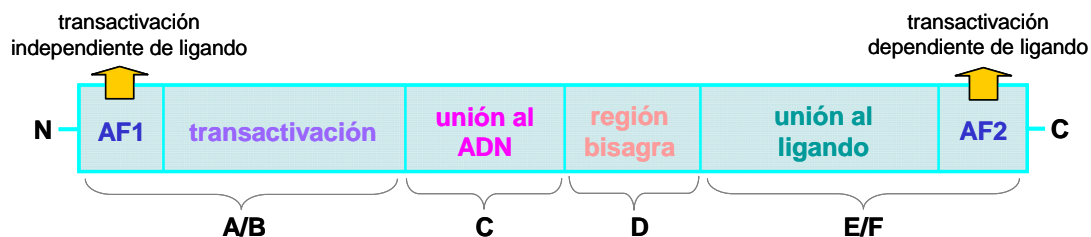
Bailey y Jonas Bystrom publicaron una revisión en la cual describen el papel emergente de PPAR $\beta/\delta$  en la regulación de procesos inflamatorios (Bishop-Bailey D. y Bystrom J. 2009).

### **PPAR $\gamma$**

En los seres humanos, el gen de PPAR $\gamma$  se ubica en el cromosoma ch3p25 del mapa genético y se transcribe en cuatro ARN mensajeros, dando lugar por corte y empalme alternativo a 2 isoformas del receptor, PPAR $\gamma$ 1 que se expresa de manera ubicua y PPAR $\gamma$ 2, que es específico del tejido adiposo (Luconi M. y col. 2009). PPAR $\gamma$  actúa como un regulador clave de la adipogénesis y del metabolismo de los adipocitos estimulando la sensibilidad a insulina, la disminución de la glucosa, la absorción de lípidos y su almacenamiento en órganos periféricos tales como músculo esquelético, hígado y tejido adiposo (Lehrke M. y Lazar MA. 2005). Además, se expresa en muchos componentes del sistema inmune y vascular como células endoteliales y del músculo liso, macrófagos, linfocitos, células dendríticas y monocitos donde se observó que ejerce acciones antiinflamatorias y antiateroescleróticas (Daynes RA. y Jones DC. 2002). A partir del descubrimiento de que la activación de PPAR $\gamma$  promueve aumentos en la sensibilidad a insulina, se han desarrollado numerosos ligandos sintéticos para este receptor. Las tiazolidinedionas (TZD), pioglitazona y rosiglitazona son considerados los agonistas más potentes y selectivos y se utilizan actualmente para el tratamiento de diabetes tipo 2 y resistencia a la insulina, aunque también muestran efectos positivos en las complicaciones vasculares y aterogénicas (Henke BR. 2004, Yki-Järvinen H. 2004). Además, PPAR $\gamma$  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- $\Delta^{12,14}$ -PGJ<sub>2</sub> (15dPGJ<sub>2</sub>), un derivado de PGJ<sub>2</sub>, producto de deshidratación de PGD<sub>2</sub> (Moraes LA. y col. 2006).

La estructura proteica de PPAR $\gamma$ , al igual que todos los miembros de la superfamilia de receptores nucleares, está organizada en cuatro dominios estructurales/funcionales denominados A/B, C, D y E/F (Fig. 11). A/B es el dominio N-terminal y conserva la función de activación transcripcional independiente de ligando (AF1). La región C corresponde al dominio de unión al ADN y contiene dos motivos de dedos de zinc, responsables de la unión selectiva de los heterodímeros PPAR/RXR a los elementos de respuesta de

proliferadores de peroxisomas (PPREs). Éstos son secuencias repetidas de hexanucleótidos específicos, presentes en las regiones promotoras de los genes diana. La región bisagra D es responsable de las interacciones con corepresores y coactivadores y, por lo tanto, modula la afinidad de unión al ADN. La región E/F alberga una secuencia implicada en la heterodimerización del receptor con asociados tales como RXR, el dominio de unión al ligando (LBD), que difiere completamente entre los 3 miembros de la familia PPAR, y el dominio C terminal con función de activación transcripcional dependiente de ligando (AF2) (Fajas L. y col. 1997).



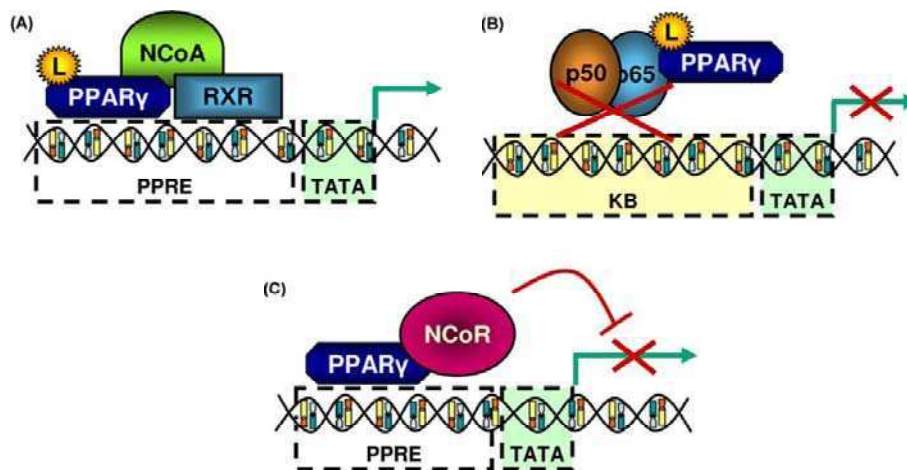
**Figura 11.** Estructura Proteica de PPAR $\gamma$ , típica de la superfamilia de receptores hormonales, indicando los dominios funcionales. Adaptado de Luconi M. y col. 2009.

### 3.1.1 Mecanismos de acción de PPAR $\gamma$

Las acciones pleiotrópicas de PPAR $\gamma$ , como la regulación de lípidos, la homeostasis glucídica y la modulación de la inflamación son ejercidas a través de mecanismos genómicos de transactivación o transrepresión dependiente de ligando. La transactivación es considerada fundamental para la inducción de genes relacionados con la adipogénesis y aquellos que regulan la homeostasis glucídica. Una vez unido al ligando, PPAR $\gamma$  heterodimeriza con RXR, se unen a secuencias PPRE en el ADN, se reclutan complejos co-activadores de receptores nucleares (NCoA) y activan la transcripción de genes específicos (Fig. 12A). Por el contrario, los efectos antiinflamatorios ejercidos por PPAR $\gamma$  dependen principalmente de mecanismos de transrepresión por los cuales se inhibe la actividad de factores de transcripción como NF- $\kappa$ B y AP-1 (Fig. 12B). Por último, PPAR $\gamma$



también puede ejercer sus efectos en ausencia de ligando mediante la unión a PPRES y reclutamiento de co-represores de receptores nucleares (NCoR), inhibiendo la transcripción génica (Fig. 12C). En presencia de ligando, se induce un cambio desde el estado de represión a uno de transactivación por la liberación de NCoR y reclutamiento de NCoA (Luconi M. y col. 2009).



**Figura 12.** Mecanismos genómicos de regulación de la transcripción génica por PPAR $\gamma$ . (A) Transactivación dependiente de ligando. (B) Transrepresión dependiente de ligando. (C) Represión de la transcripción génica independiente de ligando.

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

La prostaglandina 15dPGJ2 fue descrita por primera vez en 1983 como un producto de degradación de PGD $_2$  (Fitzpatrick FA. y Wynalda MA. 1983) y en 1995 se descubrió que 15dPGJ2 era un ligando específico del subtipo  $\gamma$  de los PPAR (Forman BM. y col. 1995, Kliewer SA. y col. 1995). Aunque la afinidad de 15dPGJ2 por PPAR $\gamma$  ( $K_d=300$  nM, aprox.) es significativamente menor que la de las hormonas esteroideas por sus receptores intracelulares, representa el ligando natural más específico para PPAR $\gamma$  (Forman BM. y col. 1995).

La síntesis de 15dPGJ2 se debe a la acción secuencial de tres clases de enzimas (Fig. 13). El paso inicial que regula la producción de todas las prostaglandinas (PGs) es la

síntesis de ácido araquidónico (AA) por fosfolipasa A<sub>2</sub>. Sin embargo, los niveles netos de PGs los determinan la expresión y actividad de las ciclooxigenasas 1 y 2 (COX1 y COX2) las cuales transforman al AA en el intermediario PGG<sub>2</sub> mediante la reacción de ciclooxigenación. Luego, reducen a PGG<sub>2</sub> por peroxidación y se genera PGH<sub>2</sub> que es convertida en prostanoideos más estables por una variedad de sintasas terminales específicas de tejidos, y cada tipo celular produce una PG específica en mayor abundancia. Sin embargo, aún no se ha identificado una sintasa específica de 15dPGJ<sub>2</sub>, sino que es un derivado de PGD<sub>2</sub>, y su síntesis depende de la maquinaria enzimática que genera PGD<sub>2</sub> (Scher JU. y Pillinger MH. 2005).

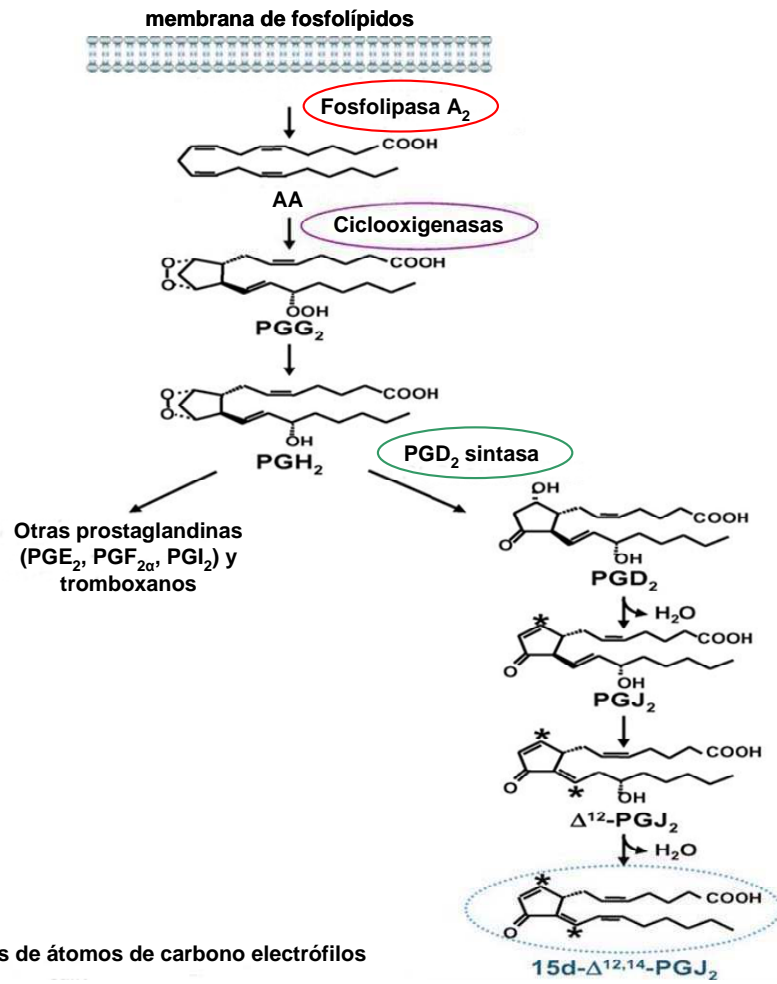
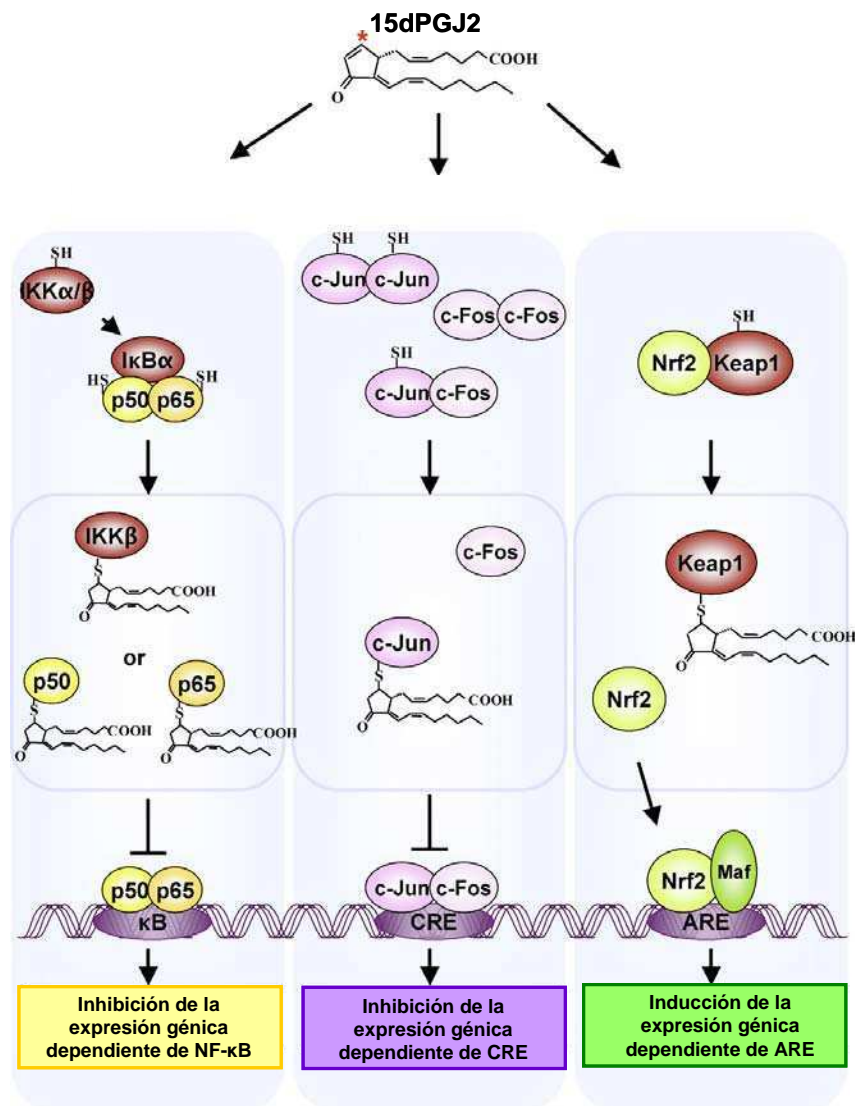


Figura 13. Esquema de la síntesis de 15-deoxi-Δ<sup>12,14</sup>-PGJ<sub>2</sub>.

Ha sido ampliamente descrito que 15dPGJ2 puede ejercer efectos que involucrarían acciones independientes de PPAR $\gamma$ , ya que éstos son demasiado rápidos como para modular la expresión génica vía su receptor (Fig. 14). Por ejemplo, ha sido demostrado que 15dPGJ2 inhibe la activación de la vía de NF- $\kappa$ B impidiendo la degradación de las proteínas inhibitorias I $\kappa$ B por inhibición del complejo IKK. Esta inhibición se produce por una modificación covalente de un residuo de cisteína, impidiendo de esa manera la unión de las subunidades p50 y p65 al ADN (Castrillo A. y col. 2000, Rossi A. y col. 2000). 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 (Cernuda-Morollon E. y col. 2001, Straus DS. y col. 2000). Además, se ha reportado que 15dPGJ2 altera la activación de AP-1 por vías independientes de PPAR $\gamma$  en varios sistemas experimentales. En células mesangiales estimuladas con IL-1 $\beta$ , 15dPGJ2 inhibe la expresión de COX2 e impide la unión de AP-1 al ADN mediante supresión de la quinasa c-Jun N-terminal (JNK) (Sawano H. y col. 2002).

Por otro lado, se ha descrito que 15dPGJ2 puede promover la formación de enlaces disulfuro con un residuo cisteína de c-Jun inactivando la expresión de genes dependientes (Perez-Sala D. y col. 2003). En condrocitos humanos 15dPGJ2, pero no el ligando sintético troglitazona, modula los efectos de IL-1 $\beta$  mediante inhibición de AP-1 y NF- $\kappa$ B (Boyault S. y col. 2001). De manera similar, en macrófagos estimulados con IFN- $\gamma$ , 15dPGJ2 fue más efectivo para inhibir la expresión de NOS2 que los ligandos sintéticos tiazolidinediona o derivados del ácido fabrico (Ricote M. y col. 1998). 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 $\gamma$  (Hovsepian E. y col. 2010). También ha sido reportado que 15dPGJ2 es capaz de activar a Nrf2 por unión directa a un residuo en la proteína supresora Keap1 resultando en la inducción de la expresión de enzimas antioxidantes (Kim EH. y Surh YJ. 2006).



**Figura 14.** Modelos propuestos para los efectos independientes de PPAR $\gamma$  ejercidos por 15dPGJ2. Adaptado de Kim EH. y Surh YJ. 2006.

### 3.2 Interleuquina 10 (IL-10)

IL-10 es una de las principales citoquinas antiinflamatorias y fue identificada originalmente como factor inhibidor de la síntesis de citoquinas (CSIF), ya que se observó que era producido por células Th2 de ratón e inhibía la activación y producción de citoquinas por células Th1 (Fiorentino DF. y col. 1989). Estudios posteriores demostraron que IL-10 regula de manera negativa ciertas funciones asociadas a la activación de macrófagos y/o monocitos tales como la producción de quimioquinas y NO, la expresión de moléculas del CMH II y coestimuladoras, la producción de IL-12 y proliferación de LT (de Waal Malefyt R. y col. 1993, Ding L. y Shevach EM. 1992, Ding L. y col. 1993). Asimismo, estudios *in vivo* e *in vitro* demostraron la actividad pleiotrópica de IL-10 ya que ejerce sus efectos sobre diferentes tipos celulares como mastocitos, LB o LT (Rousset F. y col. 1992, Thompson-Snipes L. y col 1991).

Se han propuesto varios mecanismos por los cuales IL-10 inhibe la síntesis de citoquinas proinflamatorias. Uno de los más estudiados es la inhibición de la activación del factor de transcripción nuclear NF- $\kappa$ B en monocitos y LT, por medio de un proceso donde intervienen segundos mensajeros del tipo de radicales libres de oxígeno (de Waal Malefyt R. y col. 1991). Otro mecanismo que explica los efectos antiinflamatorios de IL-10 es la inhibición de la producción de IFN- $\gamma$  mediante la activación de factores de transcripción del grupo STAT (O'Farrell AM. y col. 1998). La disponibilidad de animales *knock out* permitió poner en evidencia el papel destacado de esta citoquina en el control de respuestas proinflamatorias. Los ratones *IL-10<sup>-/-</sup>* desarrollan enterocolitis crónica y presentan respuestas inflamatorias desreguladas (Kuhn R. y col. 1993, Rennick D. y col. 1995). Por otro lado, ha sido descrito que IL-10 promueve estabilización de la matriz extracelular a través de la inducción de la síntesis del inhibidor tisular de MMPs tipo I (TIMP-1), desempeñando un papel significativo en la remodelación de la MEC (Lacraz S. y col. 1995).

#### 3.2.1 Señalización por IL-10

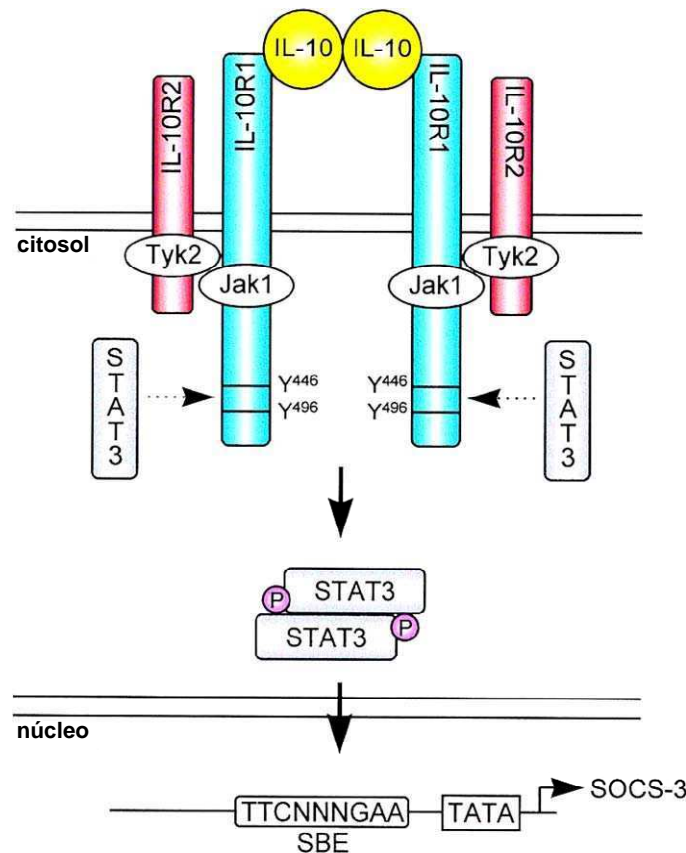
El efecto pleiotrópico de IL-10 está asociado a la amplia distribución tisular de su receptor (IL-10R), el cual está compuesto, por lo menos, por dos subunidades: IL-10R1 e IL-10R2. La subunidad IL-10R1 se asocia al reconocimiento del ligando y su nivel de

expresión puede ser regulado mediante distintos estímulos. La expresión cardíaca de IL-10R1 fue determinada por Cai ZP. y col (2012) tanto en corazones como en miocardiocitos aislados, en un modelo murino de isquemia y reperfusión. La subunidad IL-10R2, es la responsable de la señalización intracelular vía JAK-STAT, y se expresa constitutivamente en la mayoría de las células y tejidos estudiados. Las proteínas de IL-10 forman homodímeros que se unen a IL-10R, siendo requisito que ambas cadenas del receptor estén presentes para que IL-10 pueda ejercer sus funciones biológicas (Moore KW. y col. 2001).

La vía de señalización cuya activación por IL-10R ha sido ampliamente estudiada es la vía Jak/Stat que consiste en cuatro tirosina quinasas de la familia Janus (JAK-1, JAK-2, JAK-3, y TYK-2) y siete factores de transcripción STAT (1, 2, 3, 4, 5a, 5b y 6) los cuales se encuentran normalmente en el citoplasma en formas monoméricas inactivas. Dependiendo del tipo celular, los IL-10R utilizan una combinación diferente de JAK/STAT. En respuesta a IL-10, se activan dos tirosina quinasas de la familia Jak: Jak1 y Tyk2, las cuales se encuentran constitutivamente asociadas a dominios citoplasmáticos de ILR1 e ILR2 respectivamente. Una vez activadas, estas quinasas fosforilan residuos tirosina en los dominios citoplasmáticos de IL-10R1. Esto promueve el reclutamiento STAT1, STAT3 o STAT5 al complejo IL-10/IL-10R, su fosforilación, posterior dimerización y finalmente ingreso al núcleo donde actúan como factores de transcripción (Donnelly RP. y col. 1999, Weber-Nordt RM. y col. 1996, Wehinger J. y col. 1996). La figura 15 proporciona un modelo simplificado de señalización por IL-10, en la cual la unión de homodímeros de IL-10 a su receptor activa Jak1 y Tyk2, las cuales fosforilan residuos tirosina específicos (Y427, Y477) en el dominio intracelular de IL-10R1. Estos residuos, junto con secuencias peptídicas flanqueantes, actúan como sitios de acoplamiento temporales del factor de transcripción STAT3, que es fosforilado por Jak1. P-STAT3 forma homodímeros que se translocan al núcleo donde se unen a secuencias específicas en los promotores de los genes de respuesta a IL-10 (SBEs). La activación de STAT3 no es exclusiva de la señalización por IL-10 sino que, por el contrario, puede ser activada por muchas otras citoquinas como IL-6, factores de transcripción y proteínas oncogénicas (Cao X. y col. 1996, Zhong Z. y col. 1994). Dado que la fosforilación de STAT3 puede ser inducida por citoquinas con efectos tan divergentes como IL-6 e IL-10, este factor de transcripción ha

sido relacionado con numerosos procesos como inflamación, cáncer, proliferación, apoptosis y angiogénesis (Aggarwal BB. y col. 2009).

En respuesta a la señalización por citoquinas, STAT3 activa ciertos genes cuyos productos fueron identificados a mediados de los años '90 como supresores de la señalización por citoquinas (SOCS) (Starr R. y col. 1997). Actualmente se conocen ocho miembros de esta familia: la proteína que contiene al dominio SH2 inducible por citoquinas (CIS) y SOCS-1 a SOCS-7. Entre ellas, SOCS-1 y SOCS-3 son las únicas inducidas por la señalización mediada por IL-10 (Cassatella MA. y col. 1999, Ding Y. y col. 2003).



**Figura 15.** Esquema de activación de STAT3 y SOCS-3 mediado por IL-10. Adaptado de Donnelly RP. y col. 1999.

### 3.2.1.1 SOCS-3 como regulador de la respuesta inflamatoria

A partir de su descubrimiento, SOCS-3 ha sido reconocido como un regulador clave de la respuesta inflamatoria. Si bien su expresión es inducida por citoquinas con efectos tan divergentes como IL-6 e IL-10, numerosos trabajos han reportado que es capaz de inhibir los efectos proinflamatorios inducidos por IL-6 a través de su unión a determinados residuos de tirosina presentes en el receptor de IL-6 pero no en el de IL-10 (Nicholson SE. y col. 2000, Niemand C. y col. 2003, Schmitz J. y col. 2000, Stahl N. y col. 1995, Yasukawa H. y col. 2003). Otros trabajos han demostrado que SOCS-3 modula la señalización por IL-6 *in vivo* (Crocker BA. y col. 2003), que inhibe la señalización por IFN- $\gamma$  en macrófagos estimulados con LPS (Stoiber D. y col. 1999) y que inhibe la apoptosis inducida por TNF- $\alpha$  en células beta del páncreas (Bruun C. y col. 2009). Asimismo, en un modelo murino de artritis se observó que la administración periarticular de adenovirus que expresa SOCS-3 indujo reducción de la inflamación e hinchazón de las articulaciones (Shouda T. y col. 2001).

Si bien el mecanismo por el cual SOCS-3 ejerce sus efectos antiinflamatorios aún no ha sido del todo dilucidado, se ha descrito que podría inhibir la activación de la vía de NF- $\kappa$ B. En macrófagos estimulados con una proteína de *M. tuberculosis* se reportó que ésta induce fosforilación de SOCS-3 lo que promueve su interacción con el complejo I $\kappa$ B- $\alpha$ /NF- $\kappa$ B impidiendo la degradación citosólica de I $\kappa$ B- $\alpha$  y por lo tanto la translocación de la subunidad p65 al núcleo (Nair S. y col. 2011).



## 1 Objetivo general

Estudiar el papel de 15dPGJ2 y de IL-10 en la modulación de mediadores inflamatorios en miocardiocitos neonatales infectados con *T. cruzi*.

## 2 Objetivos específicos

- Caracterizar la respuesta inflamatoria de miocardiocitos infectados con *T. cruzi* y estudiar los efectos de 15dPGJ2 sobre diferentes mediadores inflamatorios.
- Identificar los mecanismos dependientes e independientes de PPAR $\gamma$  en los efectos ejercidos por 15dPGJ2 en miocardiocitos infectados con *T. cruzi*. Evaluar la participación de las vías de señalización de NF- $\kappa$ B y MAPK.
- Evaluar los efectos de la adición exógena de IL-10 sobre mediadores inflamatorios en miocardiocitos infectados.
- Estudiar la activación de la vía de señalización de STAT3/SOCS-3 en los efectos antiinflamatorios de IL-10.

## 1 Reactivos

El agonista de PPAR $\gamma$ , 15-deoxi- $\Delta^{12,14}$ -prostaglandina J2, y el antagonista específico de PPAR $\gamma$ , GW9662, fueron adquiridos en Sigma-Aldrich Co., así como el inhibidor del proteosoma MG132. La IL-10 recombinante de ratón fue suministrada por BD Pharmigen<sup>TM</sup> y el inhibidor de STAT3 (Stat3 inhibitor V, stattic) fue adquirido a Santa Cruz Biotechnology Inc. En algunos experimentos se utilizó el inhibidor específico de ERK1/2 MAPK, PD98059 el cual fue adquirido a Calbiochem.

Los medios de cultivo DMEM y M-199 fueron suministrados por Life Technologies Inc. (Gibco<sup>TM</sup>), el SFB utilizado fue de Internegocios S.A., los antibióticos penicilina y estreptomicina fueron adquiridos en Sigma-Aldrich Co. al igual que la tripsina de páncreas porcino.

Los anticuerpos empleados fueron de Santa Cruz Biotechnology Inc. (anti-I $\kappa$ B $\alpha$ , anti-NOS2, anti-p65, anti P-S32-I $\kappa$ B $\alpha$  y anti-Sp1), de New England Biolabs (anti-P-ERK1/2), de Cell Signaling Technology (P-Tyr705-STAT3) o de Sigma-Aldrich Co. ( $\alpha$ -actina,  $\alpha$ -actinina y los anticuerpos secundarios conjugados con HRP o FITC). El *kit* comercial de ELISA para la detección de IL-10 (OptEIA) fue suministrado por BD Biosciences.

Para la determinación de la síntesis de NO a tiempo real se utilizó una sonda fluorescente DAF-FM, adquirida en Molecular Probes.

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 Millipore<sup>TM</sup> (Biopore), y los reactivos quimioluminiscentes (ECL) 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 en

Sigma–Aldrich Co. La gelatina utilizada para los ensayos de zimografía (tipo A de piel porcina para electroforesis) fue suministrada por Sigma–Aldrich Co.

El Trizol, la transcriptasa reversa (M-MVL) y el inhibidor de ribonucleasas (RNAsa OUT™), 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 5 x HOT FIREPol Eva Green qPCR Mix Plus (ROX), de Solis Biodyne, adquirido en Biocientífica S.A.

Los oligonucleótidos de ARN de interferencia (siARN) de PPAR $\gamma$  (PPARGMSS-207863, -207864, -276435) y la oligofectamina fueron adquiridos en Life Technologies, Inc. El oligonucleótido de ARN de interferencia de SOCS-3 fue de Santa Cruz Biotechnology Inc.

## **2 Ratones e infección con *T. cruzi***

Ratones CF-1 de 21 días de vida fueron infectados por vía intraperitoneal con  $2 \times 10^5$  tripomastigotes de la cepa pantrópica/reticulotrópica letal RA de *Trypanosoma cruzi* tal como se describió anteriormente (Gonzalez Cappa SM. y col. 1981a). Esta población parasitaria de *T. cruzi* fue aislada de un paciente en la etapa aguda de la enfermedad de Chagas y pertenece al linaje VI según la nomenclatura actual (González Cappa SM. y col. 1981a, Zingales B. y col. 2009).

Todos los procedimientos involucrando animales fueron aprobados por el comité de ética del CONICET mediante la utilización de guías de la ANMAT y SENASA basadas en la guía de uso y cuidado de animales de laboratorio del NIH, USA.

### **2.1 Obtención de tripomastigotes**

Los ratones CF-1 infectados con la cepa RA de *T. cruzi* fueron sacrificados al día 8 post infección, correspondiente al pico de parasitemia y sangrados en esterilidad por punción cardíaca. La sangre obtenida fue diluida 5:1 en DMEM, centrifugada a 400 g durante 7 min a temperatura ambiente y mantenida en baño a 37° C por 1 h. Los tripomastigotes del sobrenadante fueron aislados y centrifugados a 5000 g durante 5 min

a temperatura ambiente. El sobrenadante fue descartado y el recuento de parásitos se realizó en cámara de Neubauer.

### **3 Cultivo primario de miocardiocitos neonatales de ratón**

Ratones neonatos de 1 a 3 días de vida de la cepa CF-1 fueron sacrificados por dislocación cervical. Se obtuvieron los corazones y se los mantuvo en solución salina de Hanks estéril (HBSS 1) (en g/l: 0,4 KCl, 0,06 KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 8,0 NaCl y 0,05 Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, pH 7,4) en hielo. Luego de tres lavados sucesivos con HBSS 1, los tejidos fueron disgregados mecánicamente en fragmentos más pequeños. Las células fueron aisladas tras sucesivas digestiones con tripsina de páncreas porcino (0,25% peso/vol en HBSS 1) a 37° C con agitación a 200 rpm. Las células liberadas tras el primer lavado fueron descartadas, y las obtenidas de las digestiones subsiguientes fueron mantenidas en igual volumen de HBSS 1 con Ca<sup>2+</sup> y Mg<sup>2+</sup> (HBSS 2) (en g/l: HBSS 1 más 0,14 CaCl<sub>2</sub>, 0,047 MgCl<sub>2</sub>, 0,049 MgSO<sub>4</sub>, 0,35 NaHCO<sub>3</sub> y 1,0 D-glucosa, pH 7,4) hasta el aislamiento de la mayor cantidad posible de células, tal como fue descrito (Aoki MP. y col. 2004). Una vez aisladas, las células fueron centrifugadas por 8 min a 200 g y resuspendidas en medio de cultivo DMEM: M-199 en relación 4:1, vol/vol suplementado con 10% SFB y antibióticos (50 µg/ml de penicilina y estreptomina). Luego, fueron colocadas en botellas de cultivo e incubadas durante 2 h a 37° C en atmósfera humidificada con 5% de CO<sub>2</sub>, permitiendo de esta manera la adhesión de poblaciones no miocíticas (en particular fibroblastos) y el enriquecimiento de la población no adherente miocardiocítica. Las células en suspensión fueron recolectadas y cultivadas a una densidad de 1 x 10<sup>5</sup> células por cm<sup>2</sup> con 10% SFB en medio de cultivo DMEM: M-199 y antibióticos.

#### **3.1 Inmunomarcación de miocardiocitos en cultivo**

El enriquecimiento de los cultivos primarios de células cardíacas en miocardiocitos fue evaluado mediante ensayos inmunocitoquímicos. Las células fueron crecidas sobre portaobjetos redondos de cristal hasta un 40% de confluencia, luego fijadas y permeabilizadas con acetona fría por 10 min y mantenidos a -20° C. Una vez fijadas, las células fueron bloqueadas durante 30 min con una solución de BSA al 3% en PBS 1X e incubadas durante toda la noche en cámara refrigerada a 4° C con anticuerpo anti  $\alpha$ -actinina (1:50). Luego de sucesivos lavados con PBS 1X, los preparados fueron

incubados durante 1 h con una dilución apropiada (1:3000) de anticuerpo anti-IgG de conejo conjugado a FITC y luego montados con glicerol al 10% en PBS 1X. Se observaron como mínimo 20 campos microscópicos al azar (400X) y se tomaron registros utilizando una cámara digital Spot RT acoplada a un microscopio de fluorescencia Nikon Eclipse 600 (Nikon Inc., USA), suplementado con los filtros de excitación y emisión adecuados.

### **3.2 Tinción con azul tripán**

Para determinar la viabilidad celular, los miocardiocitos fueron diluidos en una solución del colorante de exclusión azul tripán (0,4% en PBS 1X) y por microscopía óptica (400x) se cuantificó en cámara de Neubauer el número de células vivas (refringentes) y muertas (azules). El porcentaje de células viables se determinó como el número de células viables sobre el número de células muertas más las células viables (total).

### **3.3 Infección de miocardiocitos con tripomastigotes de *T. cruzi***

Las células cardíacas fueron cultivadas en placas de 6 pocillos con  $2 \times 10^6$  células/pocillo o en placas de 24 pocillos sobre portaobjetos de vidrio redondos, según los experimentos a realizar y crecidas hasta un 80% de confluencia, salvo en los ensayos inmunocitoquímicos y de transfección con ARN de interferencia, donde se trabajó con cultivos de miocardiocitos a un 40% de confluencia. Una vez obtenida la confluencia deseada, el medio de cultivo fue reemplazado por DMEM: M-199 4:1 (vol /vol) con 5% de SFB y antibióticos, y los cultivos fueron mantenidos en estas condiciones por lo menos 3 h antes de recibir los diferentes tratamientos o de ser infectados. La relación de 5 parásitos por célula fue la elegida para realizar los experimentos ya que es la mínima relación capaz de inducir respuesta inflamatoria significativa.

Las células cardíacas en cultivo fueron infectadas con tripomastigotes de la cepa RA de *T. cruzi* a diferentes tiempos según el experimento a realizar o tratadas con 15dPGJ2, IL-10, GW9662, MG132, PD98059 o transfectadas con ARN de interferencia para PPAR $\gamma$  (siARN-PPAR $\gamma$ ) o SOCS-3 (siARN-SOCS-3). La prostaglandina 15dPGJ2 fue resuspendida en etanol, el antagonista GW9662 y los inhibidores fueron resuspendidos en DMSO y los ARN de interferencia en agua estéril, libre de RNAsas.

### 3.3.1 Inmunofluorescencia de miocardiocitos infectados

Las células fueron crecidas sobre portaobjetos redondos de cristal hasta un 40% de confluencia. Algunos portaobjetos fueron infectados con *T. cruzi* o pretratados con 15dPGJ2 y/o ARN de interferencia para PPAR $\gamma$  a distintos tiempos según los diferentes experimentos. Tras sucesivos lavados con PBS 1X, los miocardiocitos fueron fijados y permeabilizados con acetona fría por 10 min y mantenidos a -20° C.

Una vez fijadas, las células fueron bloqueadas durante 30 min con una solución de BSA al 3% en PBS 1X e incubadas durante 1 h con suero policlonal de conejo dirigido contra *T. cruzi* en dilución 1:200 (determinada por titulación). Luego de tres lavados con PBS 1X, se agregó a los preparados una dilución apropiada de anticuerpo anti-IgG de conejo conjugado a FITC (1:3000). La contra tinción fue realizada con azul de Evans (1:10000) en los casos en que fue requerida. Los cubreobjetos fueron montados con glicerol al 10% en PBS 1X. Se observaron como mínimo 20 campos microscópicos al azar (400X) y se tomaron registros de 1000 células por preparado utilizando una cámara digital Spot RT acoplada a un microscopio de fluorescencia Nikon Eclipse 600 (Nikon Inc., USA), suplementado con los filtros de excitación y emisión adecuados. La cuantificación celular fue realizada mediante el programa ImageJ (NIH, USA) tal como fue descrito anteriormente (Maggini J. y col. 2010). La intensidad de infección fue cuantificada integrando el área de fluorescencia bajo el supuesto de que la densidad de pixeles es directamente proporcional al número de parásitos intracelulares. Los datos obtenidos fueron analizados utilizando el programa ImageJ (NIH, USA).

### 3.4 Determinación de nitritos/nitratos

La cantidad de óxido nítrico (NO) acumulado en el sobrenadante celular se cuantificó según el método de Griess reduciendo los nitratos a nitritos, los cuales fueron cuantificados (NOx  $\mu$ M) por espectrofotometría. La absorbancia a 540 nm fue comparada con una curva estándar de NaNO<sub>2</sub>.

La determinación a tiempo real de la síntesis de NO se realizó incubando las células con una sonda fluorescente DAF-FM, siguiendo las recomendaciones del proveedor. El DAF-DM es un compuesto virtualmente no fluorescente hasta que reacciona con NO para formar un benzotrizol fluorescente, con una excitación/emisión máxima de 495/515 nm. Los niveles de NO producidos fueron cuantificados integrando el área de fluorescencia

bajo el supuesto de que la densidad de pixeles es directamente proporcional la cantidad de NO. Los datos obtenidos fueron analizados utilizando el programa ImageJ (NIH, USA).

#### 4 RT-PCR cuantitativa y a tiempo real (Q-RT-PCR)

Se extrajo ARN total de células infectadas con *T. cruzi* o preincubadas con los diferentes tratamientos, y de sus respectivos controles, mediante la utilización del reactivo de Trizol siguiendo las instrucciones del proveedor. El ARN total obtenido fue tratado con DNAsa y la concentración de ARN de cada muestra fue determinada mediante espectrofotometría a una absorbancia de 260 nm y la pureza, con la razón entre 260-280 nm. El ARN (1 µg por muestra) fue transcrito en reversa, mediante la utilización de oligo dT y dNTPs, según indicaciones del fabricante de la transcriptasa reversa.

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), fueron las siguientes (F: forward o directo, R: reverse o indirecto):

Nombre	Secuencia
<b>NOS2</b>	F: 5'-CACAGCAATATAGGCTCATCCA-3' R: 5'-GGATTTTCAGCCTCATGGTAAAC-3'
<b>IL-6</b>	F: 5'-TGATGCACTTGCAGAAAACAA-3' R: 5'-GGTCTTGGTCCTTAGCCACTC-3'
<b>TNF-α</b>	F: 5'-ATGAGCACAGAAAGCATGATC-3' R: 5'-TACAGGCTTGTCACTCGAATT-3'
<b>MMP-9</b>	F: 5'-CAGACCAAGGGTACAGCCTGTT-3' R: 5'-AGTGCATGGCCGA ACTC-3'
<b>MMP-2</b>	F: 5'-CGGAGATCTGCAAACAGGACA-3' R: 5'-CGCCAAATAAACCGGTCCTT-3'
<b>PPAR<sub>γ</sub></b>	F: 5'-ATCTACACGATGCTGGC-3' R: 5'-GGATGTCCTCGATGGG-3'
<b>SOCS3</b>	F: 5'-CCTTTGACAAGCGGACTCTC-3' R: 5'-GCCAGCATAAAAACCCTTCA-3'
<b>18S</b>	F: 5'-AACACGGGAAACCTCACCC-3' R: 5'-CCACCAACTAAGAACGGCCA-3'

Todas las muestras fueron normalizadas con 18S. El protocolo de PCR utilizado fue: 52° C por 2 min, 95° C por 15 min y 40 ciclos de 95° C por 15 s y 60° C o 55° C (PPAR $\gamma$  e IL-6) por 30 s y 72° C por 1 min. Los valores de expresión cuantitativa fueron extrapolados a partir de curvas patrón para 18S, generadas con diluciones 1:10 de ADN copia (*cDNA*), por duplicado. Los valores obtenidos fueron promediados con los replicados en cada reacción, y las cantidades inducidas fueron determinadas considerando 1 al valor obtenido en el tiempo 0 (control). Los niveles relativos de expresión de cada gen de interés se calcularon con la fórmula  $2^{-\Delta\Delta Ct}$ , donde  $\Delta Ct$  representa  $Ct$  (gen de interés) –  $Ct$  (18S) (Livak KJ. y Schmittgen TD. 2001).

### **5 Determinación de la producción de IL-10**

La síntesis de IL-10 fue evaluada en sobrenadantes de miocardiocitos sin infectar e infectados, por el método de ELISA de captura siguiendo las instrucciones del fabricante. La reacción fue detectada incubando las muestras con una solución de estreptavidina conjugada con peroxidada de rábano picante (strep-HRP, dilución 1:200 en el diluyente). Luego se les agregó la solución sustrato (mezcla 1:1 de tetrametilbenzeno con peróxido de hidrógeno) a cada pocillo y se midió la absorbancia a 405 nm, restando la absorbancia basal. La concentración de IL-10 (pg/ml) presente en cada muestra se calculó a partir de la curva patrón.

### **6 ARN de interferencia (siARN)**

Los miocardiocitos fueron cultivados hasta un 30-50% de confluencia y luego se mantuvieron toda la noche en medio de cultivo DMEM: M-199 (4:1) con 5% SFB y sin antibióticos. Para la transfección se utilizó oligofectamina y se incubó con los tres oligonucleótidos de siARN de PPAR $\gamma$  o con los oligonucleótidos de siARN de SOCS-3 según instrucciones del fabricante, por 5 h a 37° C en atmósfera humidificada con 5% de CO<sub>2</sub>. Al cabo de 48 y 72 h post transfección, se realizaron ensayos de actividad génica. El impacto del silenciamiento con siARN-PPAR $\gamma$  y con siARN-SOCS-3 sobre los ARNm de PPAR $\gamma$  y de SOCS-3 fue evaluado por Q-RT-PCR.



## **7 Preparación de extractos proteicos citosólicos, nucleares y totales.**

Las células infectadas con *T. cruzi* (y sus controles) fueron lavadas con PBS 1X y mantenidas a -80° C hasta el momento de preparación de los extractos. Las placas fueron raspadas para levantar las células y homogeneizadas en 100 µl de tampón H (Hepes 10 mM pH 7.9, EDTA 1 mM, EGTA 1 mM y KCl 10 mM) conteniendo DTT 1mM, PMSF 0,5 mM, FNa 100 mM, NaVO<sub>4</sub> 200 mM y una combinación de inhibidores de Proteasas (AEBSF 104 mM, Aprotinina 80 µM, Bestatina 4 mM, E-64 1,4 mM, Leupeptina 2 mM y Pepstatina A 1,5 mM). Los homogenizados fueron mantenidos en hielo por 15 min al cabo de los cuales se les agregó Nonidet P-40 10% y se los agitó vigorosamente por 15 s y centrifugó en frío a 1600 g durante 30 s. El sobrenadante fue congelado y almacenado a -20° C (extracto citosólico). Al precipitado se lo resuspendió en 70 µl de tampón C frío (Hepes 20 mM pH 7,9, NaCl 0,4 M, EDTA 1 mM, EGTA 1 mM, glicerol 20% y todos los componentes e inhibidores mencionados anteriormente), y se lo agitó durante 30 min a 4° C. El sobrenadante obtenido fue centrifugado 15 min a 1600 g y 4° C y almacenado a -80° C (extracto nuclear).

Para la obtención de los extractos proteicos totales, las células fueron lavadas con PBS 1X, se les agregó 100 µl de tampón de lisis OGP y se las mantuvo en cámara refrigerada durante 30 min y en agitación constante. Luego, se las centrifugó a 2000 g a 4° C durante 15 min. El sobrenadante obtenido fue traspasado a un tubo limpio y mantenido a -20°C.

### **7.1 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 (1 mg/ml) como patrón. La concentración de proteína presente en cada muestra se calculó a partir de la curva patrón medida a una absorbancia de 595 nm.

### **7.2 Análisis de proteínas por Western blot**

Los extractos de proteínas tanto nucleares como citosólicos y totales, previos a ser sometidos a electroforesis, fueron calentados a 95° C durante 10 min con tampón Laemmli (Tris-HCl 60 mM 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 µg)

fueron sometidas a electroforesis (90 min 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 400 mA por 130 min. Luego, las membranas fueron bloqueadas durante 1 h 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 1 h a temperatura ambiente con el segundo anticuerpo conjugado con peroxidasa. Finalizada la incubación, se realizaron 3 lavados de 15 min 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).

## 8 Zimografía

La actividad de MMP-9 y MMP-2 en el medio de cultivo fue analizada mediante zimogramas, en los cuales se evidencia la actividad gelatinolítica propia de estas MMPs. Las proteínas presentes en los sobrenadantes celulares (100 µg de proteínas) fueron sujetos a electroforesis en geles SDS-PAGE de 7,5%, conteniendo 1 mg/ml de gelatina (tipo A de piel porcina). Una vez finalizada la electroforesis, los geles fueron lavados con 30% Triton X-100 en agua bidestilada por 60 min para remover el SDS. Luego los geles fueron incubados en tampón Tris 50 mM pH 7,4 conteniendo 0,15 mM de NaCl y 30 mM de CaCl<sub>2</sub>, por 72 h a 37 °C. Los geles fueron teñidos con azul de Coomasie por 3 h y desteñidos con una solución de metanol 30% y ácido acético 10% en agua destilada. Las áreas de actividad proteolítica se evidenciaron como bandas de tinción negativa sobre el fondo oscuro teñido. Los geles fueron fotografiados en un gabinete Image Quant 300 (GE Healthcare) siguiendo las instrucciones del fabricante. Las regiones que representaban actividad de MMPs fueron cuantificadas mediante densitometría usando el programa NIH-image J.

## 9 Análisis estadísticos

Los resultados se expresan como la media  $\pm$  desviación estándar (SD) 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.

Para los porcentajes de células infectadas y el número de amastigotes por células, las diferencias fueron establecidos para un nivel de significación de  $\alpha = 0,05$  por ANOVA de una vía y la prueba de Tukey como post-test. La carga parasitaria y los niveles de NO fueron cuantificados integrando el área de fluorescencia, bajo el supuesto de que la densidad de píxeles es directamente proporcional al número de parásitos intracelulares o de NO producido. Las diferencias fueron establecidas para un nivel de significación de  $\alpha = 0,05$  por ANOVA de una vía y prueba de Bonferroni de comparación múltiple.

Los análisis estadísticos se realizaron utilizando el programa GraphPad Prism 4.0.

---

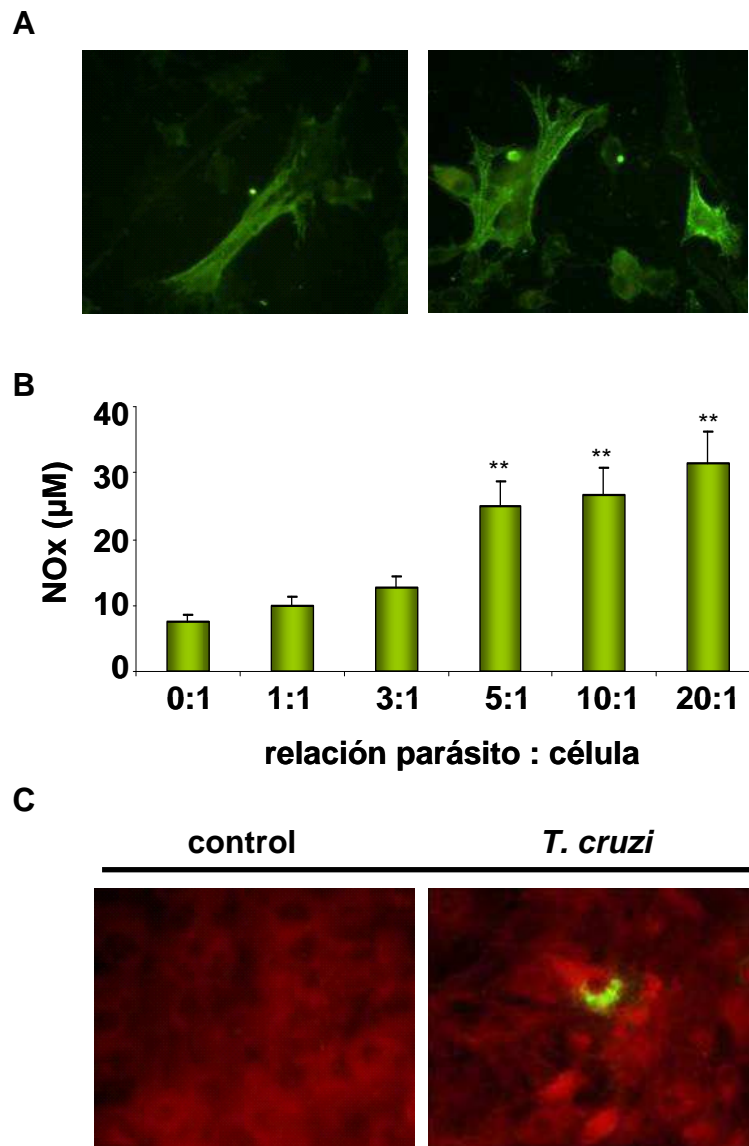
**PARTE 1: Caracterización del modelo de infección de miocardiocitos con la cepa RA de *Trypanosoma cruzi*. Evaluación de la respuesta inflamatoria.****1 Obtención de los cultivos primarios de miocardiocitos e infección con *T. cruzi***

Con el objetivo de evaluar la respuesta de los miocardiocitos frente a la infección con *T. cruzi*, utilizamos cultivos primarios de miocardiocitos aislados de ratones neonatos, ya que constituyen un modelo *ex vivo* apropiado, y se descarta la contribución de otros tipos celulares presentes en el corazón. En trabajos anteriores de nuestro grupo se demostró que las células cardíacas neonatales en cultivo, a diferencia de aquellas aisladas de animales adultos, son capaces de responder a estímulos inflamatorios como LPS y citoquinas (Cuenca J. y col. 2007, Goren N. y col. 2004).

En primer lugar se analizó la pureza en miocardiocitos de los cultivos primarios de células cardíacas mediante ensayos inmunocitoquímicos. Para ello, una vez obtenidas las células fueron cultivadas sobre portaobjetos, fijadas e incubadas con anticuerpo primario anti  $\alpha$ -actinina, una proteína abundante en los miocardiocitos que juega un papel decisivo en el proceso de contracción celular. Luego se utilizó un anticuerpo secundario conjugado a FITC y mediante microscopio de fluorescencia se observó que más del 90% de las células en cultivo estaban marcadas tal como se muestra en la figura 1A.

Una vez corroborada la pureza de nuestros cultivos, el paso siguiente fue determinar la relación parásito:célula óptima para la infección de tal manera que induzca una respuesta inflamatoria significativa, sin afectar la viabilidad de los miocardiocitos (determinada por tinción con azul tripán). Se evaluó la producción del mediador inflamatorio NO 48 h post infección, utilizando la técnica de Griess. La figura 1B muestra que la mínima relación parásitos:células capaz de inducir niveles de NO significativamente mayores a los observados en las células sin infectar es 5:1.

Dado que los tripomastigotes invaden diversos tipos celulares donde se diferencian a amastigotes, decidimos evaluar el parasitismo en nuestro modelo de infección. Mediante inmunocitoquímica de fluorescencia pudimos identificar nidos de amastigotes intracelulares en los miocardiocitos infectados con la cepa RA de *T. cruzi* (Fig. 1C).



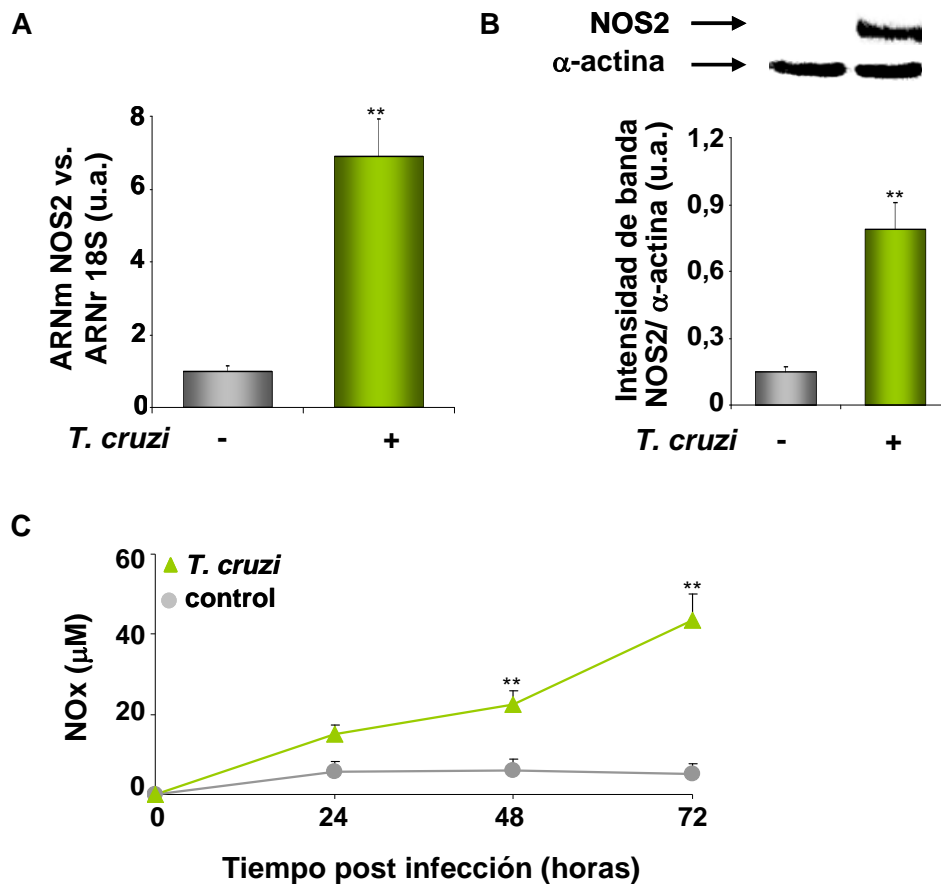
**Figura 1. Obtención de los cultivos primarios de miocardiocitos e infección con *T. cruzi*.** (A) La pureza en miocardiocitos de los cultivos primarios fue evaluada mediante inmunofluorescencia utilizando un anticuerpo anti  $\alpha$ -actinina. (B) La relación óptima de infección parásitos:miocardiocitos fue analizada mediante la determinación de (nitritos/nitratos) NOx ( $\mu$ M) acumulados en los sobrenadantes a las 48 h post infección por ensayos de Griess. (C) Inmunofluorescencia de miocardiocitos infectados con *T. cruzi*. Los cultivos primarios de miocardiocitos fueron infectados con tripomastigotes de *T. cruzi* (relación 5:1 parásitos:células). Luego de 3 h, los cultivos fueron lavados para retirar los parásitos que no invadieron células y mantenidos durante 48 h. Las células fueron incubadas con suero inmune de conejo infectado con *T. cruzi* y luego con anticuerpo conjugado a FITC, observándose amastigotes intracelulares en verde y contra tinción de los miocardiocitos con azul de Evans. Para A y C, las microfotografías (400X) son representativas de tres experimentos independientes. En B, los resultados representan cuatro experimentos independientes y los valores corresponden a la media  $\pm$  SD. \*\* $p < 0,01$  vs. control.

## 2 Parámetros inflamatorios inducidos por la infección aguda con *T. cruzi*

### 2.1 Expresión y actividad de la enzima proinflamatoria NOS2

Uno de los componentes más estudiados de la respuesta inflamatoria frente a la infección con distintos patógenos es la enzima inducible óxido nítrico sintasa (NOS2), ya que producto de su expresión se liberan grandes cantidades de NO, mediador inflamatorio por excelencia que cuenta además con la capacidad de ejercer efectos antimicrobianos. Ha sido demostrado que el NO juega un papel importante en las infecciones por *T. cruzi*. Por un lado controla la proliferación parasitaria en cultivos de esplenocitos y macrófagos peritoneales (Gutierrez FR. y col. 2009, Vespa GN. y col. 1994) aunque su producción exacerbada provoca daños favoreciendo el desarrollo de miocardiopatías en ratones infectados con *T. cruzi* (Durand JL. y col. 2009).

En este trabajo decidimos evaluar en primer lugar la capacidad de los cultivos primarios de miocardiocitos de expresar la enzima proinflamatoria NOS2 en respuesta a la infección con la cepa RA de *T. cruzi*. Para ello, los miocardiocitos fueron infectados por 48 h, al cabo de las cuales se obtuvieron extractos de ARN total para analizar si la infección induce expresión de NOS2. Mediante ensayos de RT-PCR cuantitativa y a tiempo real (Q-RT-PCR) pudimos detectar que la infección con *T. cruzi* promueve la expresión de NOS2 a nivel transcripcional, mientras que las células sin infectar expresan niveles basales (Fig. 2A). Además, se analizó la expresión de esta proteína mediante Western blot (Wb) a partir de extractos proteicos totales y utilizando un anticuerpo específico contra esta isoforma de NOS. Pudimos observar que la infección con *T. cruzi* también promueve un aumento significativo en los niveles de expresión de esta enzima respecto a los miocardiocitos sin infectar (Fig. 2B). Por último, nos preguntamos si la elevada expresión de esta enzima se correlaciona con aumentos en su actividad. Para ello, evaluamos la síntesis y liberación de NO al sobrenadante de los miocardiocitos y determinamos mediante ensayos de Griess que la infección con *T. cruzi* no sólo induce expresión de NOS2 sino que ésta es capaz de producir grandes cantidades de NO a las 48 y 72 h post infección, en comparación con los miocardiocitos sin infectar (control) (Fig. 2C).



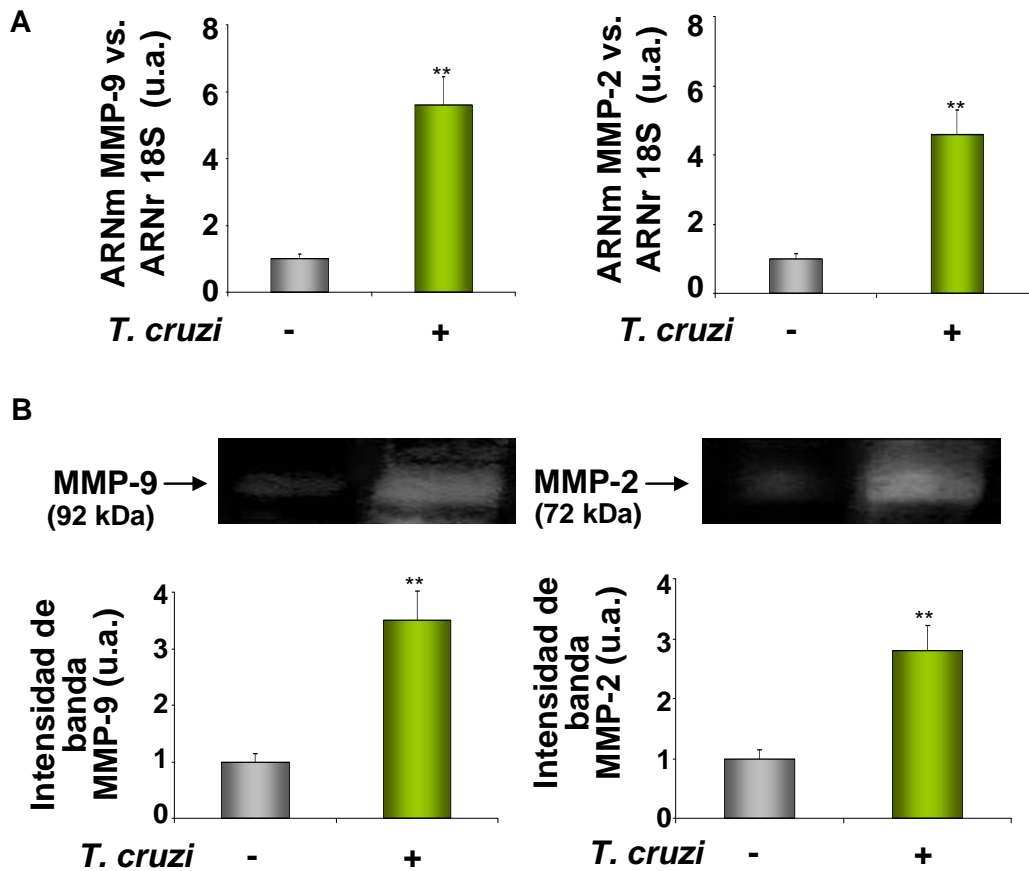
**Figura 2. Expresión y actividad de NOS2 en miocardiocitos infectados con *T. cruzi*.** (A) Los cultivos primarios de miocardiocitos fueron infectados (*T. cruzi*) o no (control) y al cabo de 48 h se cuantificaron por Q-RT-PCR los niveles de expresión del ARNm de NOS2. (B) La expresión de NOS2 fue analizada por Wb, bajo las mismas condiciones que en A, utilizando anticuerpo contra  $\alpha$ -actina para normalizar. (C) Se determinó la acumulación de (nitritos/nitratos) NOx ( $\mu$ M) a las 24, 48 y 72 h post infección mediante ensayos de Griess. Para A, los resultados representan tres experimentos independientes y los valores corresponden a la media  $\pm$  SD. La expresión del ARNm, en unidades arbitrarias (u.a.), se representa como la cantidad de ARNm de NOS2 relativa al tiempo 0 y normalizada con 18S. Para B, los resultados son representativos de tres experimentos independientes. En C, los resultados representan cinco experimentos independientes y los valores corresponden a la media  $\pm$  SD. \*\* $p < 0,01$  vs. control.

## 2.2 Expresión y actividad de las metaloproteasas MMP-9 y MMP-2

Un aspecto de gran interés en las patologías cardíacas es la producción y activación de metaloproteasas (MMPs). Se ha comprobado que estas enzimas están aumentadas en miocardiocitos frente al estrés inflamatorio así como también en enfermedades cardiovasculares como aterosclerosis y en pacientes con fallo cardíaco (Phatharajaree W. y col. 2007, Vanhoutte D. y Heymans S. 2010). Más aún, en un estudio previo de nuestro grupo demostramos que en miocardiocitos la expresión y actividad de MMP-9 están aumentadas luego de ser estimulados con LPS y que esto ocurre por mecanismos que están regulados, de manera aditiva, por el NO y prostaglandinas (Cuenca J. y col. 2006).

Dados estos antecedentes, junto con los resultados mostrados con anterioridad donde los miocardiocitos neonatales producen NO frente a la infección con *T. cruzi*, nos propusimos investigar si la síntesis y actividad de MMP-9 y MMP-2 contribuyen a esta respuesta inflamatoria. Para ello, evaluamos la expresión de estas enzimas en los miocardiocitos infectados con *T. cruzi*. Mediante Q-RT-PCR pudimos detectar un aumento significativo en los niveles de transcripción de ambas enzimas a las 48 h post infección, en comparación con miocardiocitos control (Fig. 3A). A la luz de estos resultados, evaluamos la actividad de MMP-9 y MMP-2 en sobrenadantes de miocardiocitos infectados por 72 h. Dado que ambas MMPs se caracterizan por su capacidad de degradar gelatina, su actividad puede ser evidenciada mediante ensayos de zimografía que permiten detectar la actividad gelatinolítica, observándose bandas de degradación características. La figura 3B muestra que la infección de los miocardiocitos con *T. cruzi* promueve una activación significativa de las proenzimas MMP-9 y MMP-2 respecto a las células sin infectar.



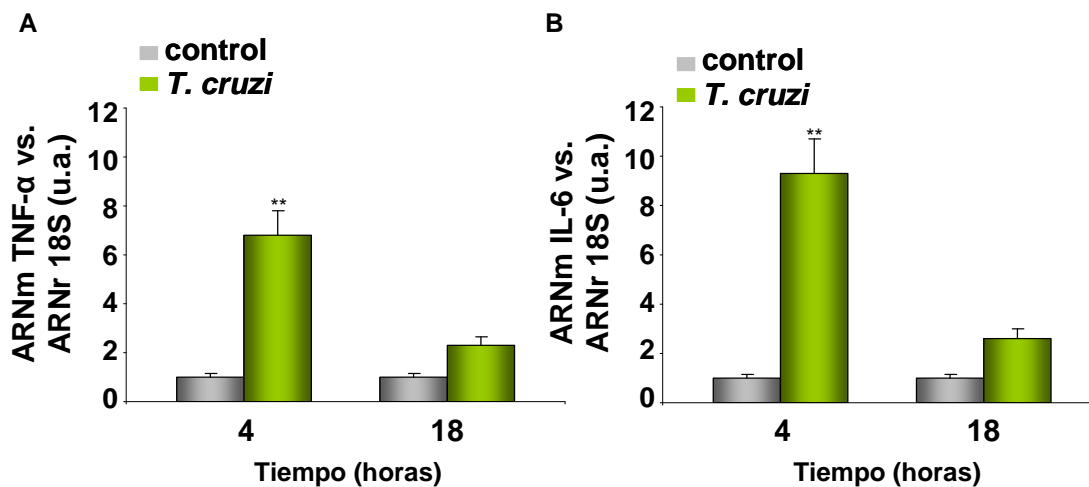


**Figura 3. Análisis de la expresión y actividad de MMP-9 y MMP-2 frente a la infección de miocardiocitos con *T. cruzi*.** (A) Se cuantificaron los niveles de transcripción de los ARNm de MMP-9 y MMP-2 a las 48 h post infección mediante Q-RT-PCR. (B) La actividad de estas metaloproteasas fue analizada a partir de sobrenadante de miocardiocitos sin infectar o infectados por 72 h en ensayos de zimografía. En A los resultados muestran un experimento representativo de tres realizados y los valores corresponden a la media  $\pm$  SD. La expresión de los ARNm, en unidades arbitrarias (u.a.), es relativa al tiempo 0 y normalizada con 18S. En B los valores están representados respecto al control en (u.a.) y los resultados son representativos de tres experimentos independientes. \*\* $p < 0,01$  vs. control.

### 2.3 Inducción de la expresión de citoquinas proinflamatorias

A partir de los resultados obtenidos, nos preguntamos si los miocardiocitos podían también responder a la infección mediante la síntesis de citoquinas inflamatorias. Se ha descrito que TNF- $\alpha$  e IL-6 son producidas en el miocardio y que ambas participan como mediadores de procesos proinflamatorios provocando daño al tejido (Engel D. y col. 2004, Gwechenberger M. y col. 1999, Morillas P. y col. 2012). Además, se ha reportado una asociación positiva entre la expresión de TNF- $\alpha$ , la presencia de fibrosis y la disfunción

cardíaca en biopsias de pacientes chagásicos (Rocha Rodrigues DB. y col 2012). Por lo tanto, investigamos si en nuestro modelo de infección de miocardiocitos con la cepa letal RA de *T. cruzi*, se induce la síntesis de estas citoquinas. Para ello, los miocardiocitos fueron infectados por 4 y 18 h, se obtuvo ARN total y mediante Q-RT-PCR se cuantificaron los niveles de los ARNm de ambas citoquinas. Pudimos observar que la infección con *T. cruzi* induce una rápida y significativa transcripción de TNF- $\alpha$  e IL-6 a las 4 h respecto a los controles, siendo no significativa a las 18 h post infección (Fig. 4).



**Figura 4. Síntesis de TNF- $\alpha$  e IL-6 en miocardiocitos infectados por 4 y 18 h.** Mediante Q-RT-PCR se cuantificaron los niveles de expresión de las citoquinas TNF- $\alpha$  (A) e IL-6 (B) en miocardiocitos control o infectados con *T. cruzi*. Los niveles de transcripción de los ARNm relativos al tiempo 0, se expresan en unidades arbitrarias (u.a.) y fueron normalizados con 18S. Los resultados representan tres experimentos independientes, y los valores corresponden a la media  $\pm$  SD. \*\*p<0,01 vs. control.

## **PARTE 2: Efectos de 15dPGJ2 sobre miocardiocitos infectados con *T. cruzi***

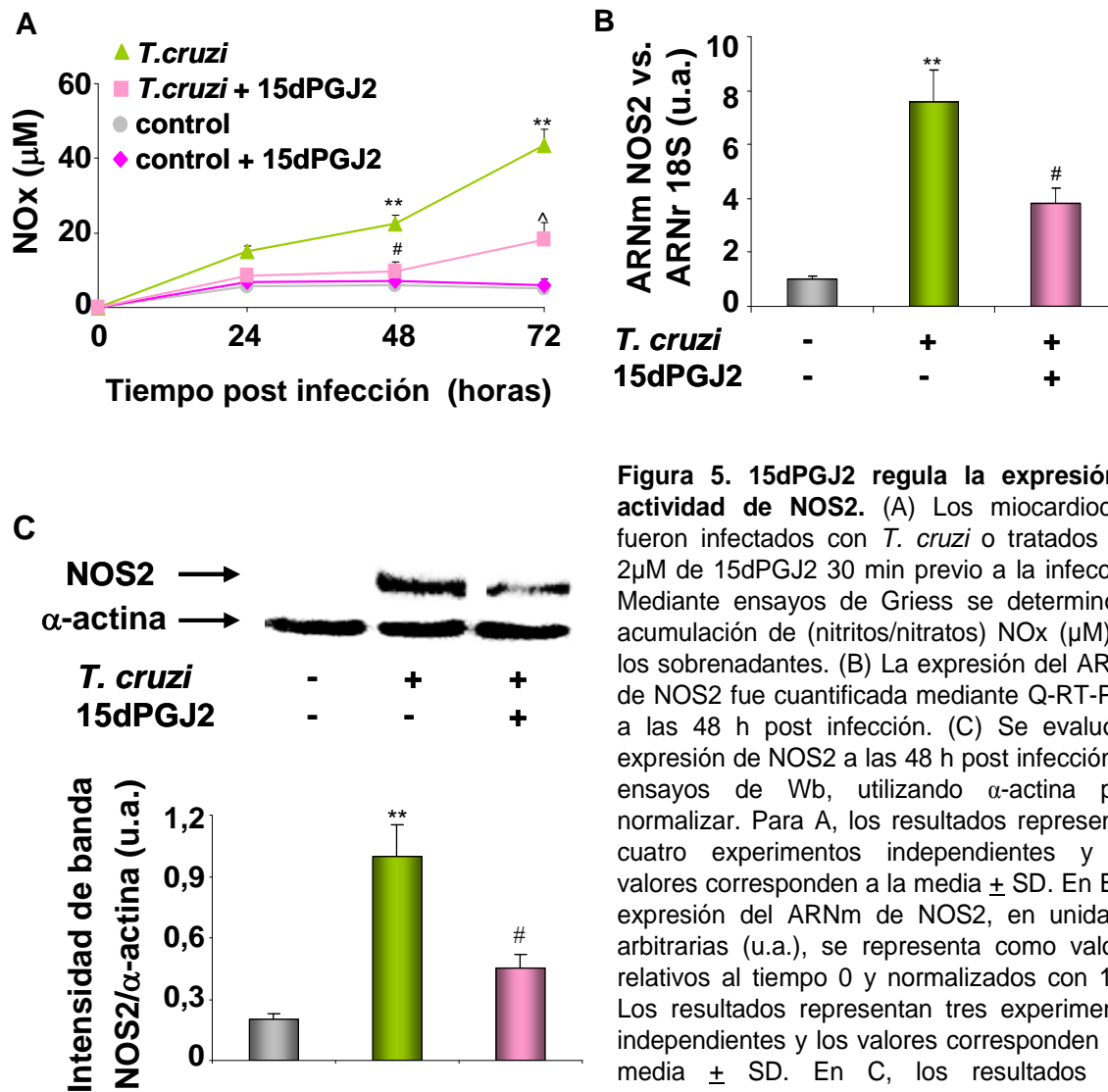
### **1 Estudio del efecto modulador de 15-deoxi- $\Delta$ 12,14-prostaglandina J2 (15dPGJ2), ligando natural de PPAR $\gamma$ , sobre la respuesta inflamatoria**

El papel de PPAR $\gamma$  en la modulación de la respuesta inflamatoria cardíaca ha sido abordado en diversos trabajos y entre ellos destacan los modelos de injuria por isquemia y reperfusión y shock endotóxico (Abdelrahman M. y col. 2005, Honda T. y col. 2008, Hovsepian E. y col. 2010, Ren Y. y col. 2009). Sin embargo, su participación como moduladores de la inflamación en infecciones con *T. cruzi* aún no ha sido del todo dilucidada. Además, dado que el desarrollo de la etapa aguda de la enfermedad de Chagas se debe en gran parte a los exacerbados eventos inflamatorios, decidimos estudiar el papel del ligando endógeno de PPAR $\gamma$  15dPGJ2, como modulador de dicha respuesta en los cultivos primarios de miocardiocitos infectados con *T. cruzi*.

#### **1.1 15dPGJ2 inhibe la síntesis y actividad de NOS2**

En primer lugar decidimos investigar el efecto del ligando de PPAR $\gamma$ , 15dPGJ2, sobre la expresión de NOS2 en los miocardiocitos infectados con *T. cruzi*. Para ello, las células en cultivo fueron tratadas con 15dPGJ2, luego infectadas y a diferentes tiempos post infección se midieron los niveles de NO liberados al sobrenadante como parámetro para evaluar la actividad de NOS2. La figura 5A muestra que 15dPGJ2 inhibe significativamente la síntesis de NO inducida por *T. cruzi* a las 48 y 72 h, respecto a los niveles presentes en el sobrenadante de células infectadas pero no tratadas. Por otro lado, evaluamos si 15dPGJ2 podría modular la transcripción del ARNm de NOS2 inducida por la infección de los miocardiocitos con *T. cruzi*. Pudimos detectar mediante ensayos de Q-RT-PCR que 15dPGJ2 regula la expresión de esta enzima a nivel transcripcional, 48 h post infección (Fig. 5B). A la luz de estos resultados, nos preguntamos si 15dPGJ2 también es capaz de regular la expresión de la proteína de NOS2. Para ello, realizamos ensayos de Wb a partir de extractos proteicos totales de miocardiocitos sin infectar, infectados por 48 h y tratados con 15dPGJ2 previo a la infección de 48 h con *T. cruzi*. La figura 5C muestra un Wb representativo donde se observa que 15dPGJ2 también inhibe la expresión de NOS2 de manera significativa, respecto a los niveles de expresión

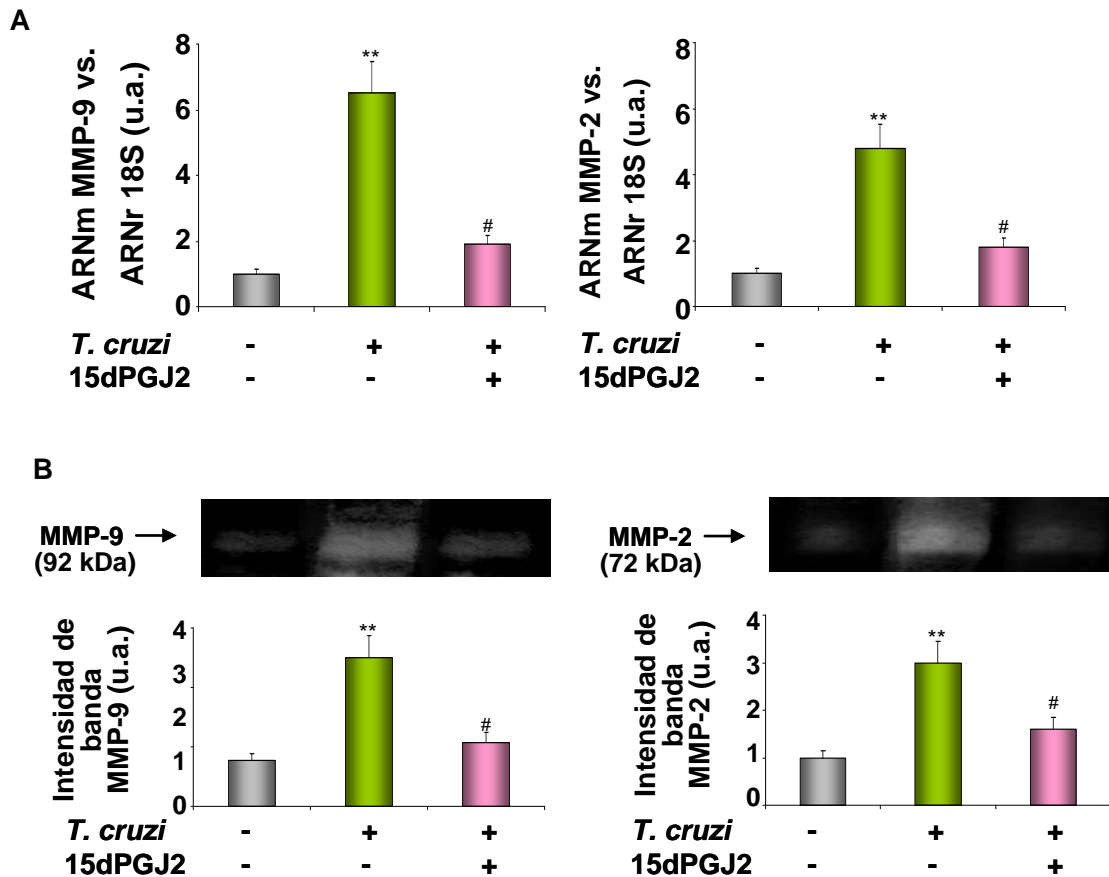
inducidos por la infección. Se realizó un control con miocardiocitos tratados con 15dPGJ2 sin infectar en el cual no se detectó ninguna diferencia respecto al control sin tratamiento ni infección. Además, la adición de 15dPGJ2 exógena no afectó la viabilidad de los miocardiocitos (determinada por tinción con azul tripán) (datos no mostrados).



**Figura 5. 15dPGJ2 regula la expresión y actividad de NOS2.** (A) Los miocardiocitos fueron infectados con *T. cruzi* o tratados con 2µM de 15dPGJ2 30 min previo a la infección. Mediante ensayos de Griess se determinó la acumulación de (nitritos/nitratos) NOx (µM) en los sobrenadantes. (B) La expresión del ARNm de NOS2 fue cuantificada mediante Q-RT-PCR a las 48 h post infección. (C) Se evaluó la expresión de NOS2 a las 48 h post infección en ensayos de Wb, utilizando α-actina para normalizar. Para A, los resultados representan cuatro experimentos independientes y los valores corresponden a la media ± SD. En B, la expresión del ARNm de NOS2, en unidades arbitrarias (u.a.), se representa como valores relativos al tiempo 0 y normalizados con 18S. Los resultados representan tres experimentos independientes y los valores corresponden a la media ± SD. En C, los resultados son representativos de tres experimentos independientes. \*\*p<0,01 vs. control; #p<0,05 vs. *T. cruzi*; ^p<0,01 vs. *T. cruzi*.

### **1.2 Inhibición de la expresión y actividad de MMPs frente a la adición de 15dPGJ2**

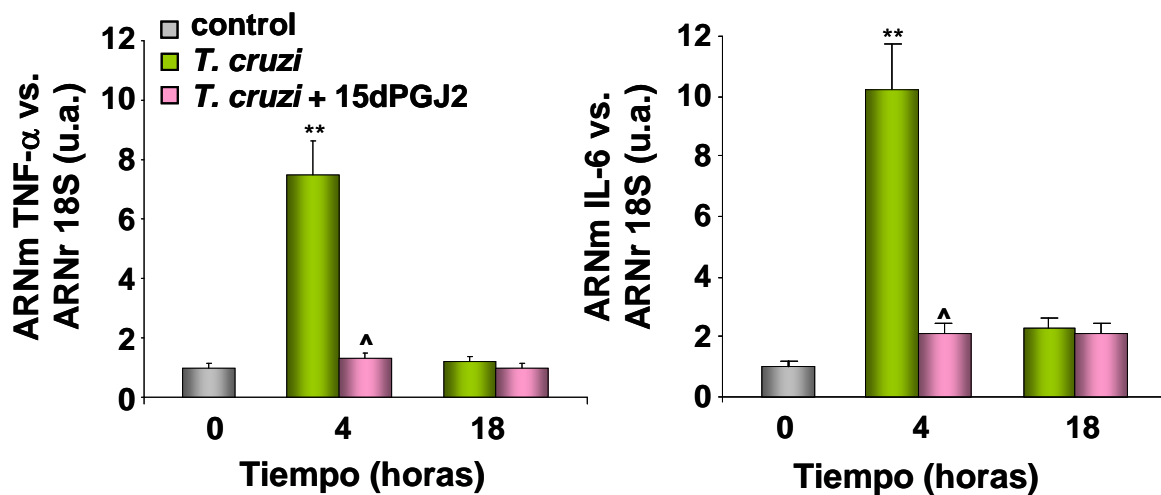
En un trabajo anterior de nuestro grupo, observamos que 15dPGJ2 inhibe la expresión y actividad de la MMP-9 en miocardiocitos estimulados con LPS (Hovsepian E. y col. 2010). A partir de este antecedente, nos preguntamos si el agonista de PPAR $\gamma$  también es capaz de modular la expresión y actividad tanto de MMP-9 como de MMP-2 inducidas por la infección de los miocardiocitos con *T. cruzi*. Para ello, los cultivos de miocardiocitos fueron infectados o tratados con 15dPGJ2 previo a la infección. Al cabo de 48 h obtuvimos ARN total, a partir del cual realizamos ensayos de Q-RT-PCR y cuantificamos los niveles de ARNm de ambas MMPs. En la figura 6A se puede observar que la adición de 15dPGJ2 a los miocardiocitos infectados con *T. cruzi* inhibe la transcripción de ambas MMPs de manera significativa respecto a la inducida por la infección. Más aún, evaluamos si la inhibición ejercida por 15dPGJ2 se correlaciona con una modulación de la actividad de estas enzimas. Para ello, sobrenadantes de miocardiocitos infectados por 72 h o tratados con 15dPGJ2 e infectados fueron sometidos a ensayos de zimografía. Pudimos detectar una inhibición significativa en la actividad gelatinolítica de las proenzimas MMP-9 y MMP-2 en los miocardiocitos infectados y tratados con 15dPGJ2 respecto a la actividad observada en los sobrenadantes de miocardiocitos infectados (Fig. 6B).



**Figura 6. Efecto de 15dPGJ2 sobre la expresión y actividad de MMP-2 y MMP-9 en miocardiocitos infectados con *T. cruzi*.** (A) Las células fueron infectadas o tratadas con 15dPGJ2 (2µM) 30 min previo a la infección. A las 48 h, se cuantificaron los niveles de expresión de los ARNm de MMP-9 y MMP-2 mediante Q-RT-PCR. (B) La actividad de ambas MMPs fue analizada en ensayos de zimografía a partir de sobrenadantes de miocardiocitos infectados por 72 h o pretratados con 15dPGJ2. En A, los niveles de transcripción de los ARNm, relativos al tiempo 0, se expresan en unidades arbitrarias (u.a.) y fueron normalizados con 18S. Los resultados muestran un experimento representativo de tres y los valores corresponden a la media ± SD. En B los valores están representados respecto al control (u.a.) y los resultados son representativos de tres experimentos independientes. \*\*p<0,01 vs. control; #p<0,05 vs. *T. cruzi*.

### 1.3 15dPGJ2 regula la síntesis de citoquinas inflamatorias

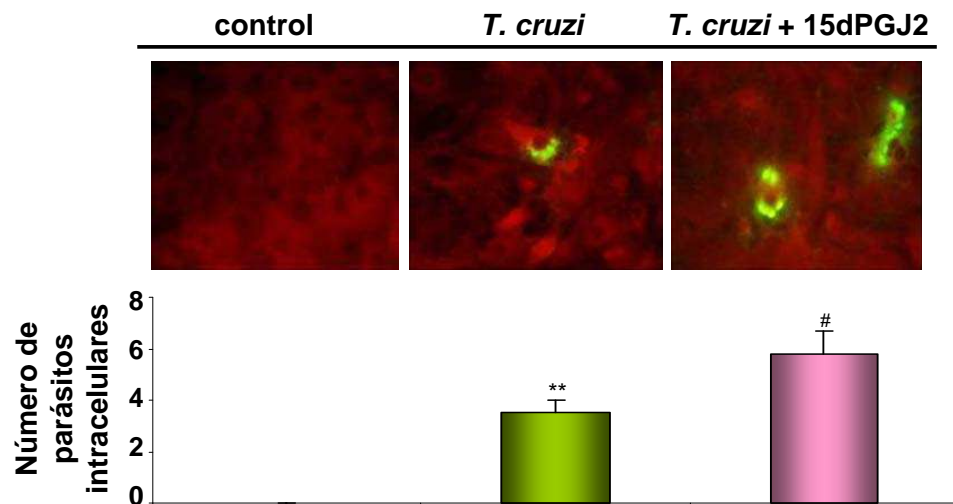
A partir de los resultados obtenidos, en los que demostramos que 15dPGJ2 inhibe la expresión y actividad de un marcador inflamatorio como la enzima NOS2, junto con la observación de que 15dPGJ2 modula la expresión y actividad de MMP-9 y MMP-2, nos preguntamos si el agonista de PPAR $\gamma$  también podría estar afectando la expresión de otros mediadores típicamente inflamatorios como las citoquinas TNF- $\alpha$  e IL-6, las cuales son inducidas por la infección de los miocardiocitos con *T. cruzi*. Para llevar a cabo este estudio, las células fueron tratadas con 15dPGJ2 e infectadas o solamente infectadas durante 4 y 18 h y analizamos mediante Q-RT-PCR los niveles de transcripción de los ARNm de ambas citoquinas. La figura 7 muestra que 15dPGJ2 es un potente inhibidor de la expresión temprana de TNF- $\alpha$  e IL-6 en miocardiocitos infectados con *T. cruzi*.



**Figura 7. 15dPGJ2 inhibe la expresión de TNF- $\alpha$  e IL-6 en miocardiocitos infectados con *T. cruzi*.** Los miocardiocitos fueron infectados con *T. cruzi* por 4 y 18 h o tratados con 15dPGJ2 (2 $\mu$ M) 30 min previo a la infección. Mediante Q-RT-PCR se cuantificaron los niveles de transcripción de las citoquinas TNF- $\alpha$  e IL-6. La expresión de los ARNm, en unidades arbitrarias (u.a), se representa como la cantidad de ARNm relativa al tiempo 0 y normalizada con 18S. Los resultados representan tres experimentos independientes, y los valores corresponden a la media  $\pm$  SD. \*\*p<0,01 vs. control; ^p<0,01 vs. *T. cruzi*.

## 2 Modulación del parasitismo por 15dPGJ2

Ha sido descrito que el NO y TNF- $\alpha$  controlan el crecimiento intracelular de *T. cruzi* en células cardíacas infectadas (Fichera LE. y col. 2004). En los resultados anteriores hemos demostrado que los tripomastigotes infectan a los miocardiocitos y que las células responden a dicha infección produciendo niveles elevados de NO y TNF- $\alpha$ , que resultan inhibidos por 15dPGJ2. Por lo tanto, nos preguntamos si la inhibición de estos mediadores ejercida por 15dPGJ2 podría estar regulando el parasitismo en los miocardiocitos infectados. Para responder esta incógnita, los miocardiocitos fueron cultivados sobre portaobjetos e infectados con *T. cruzi* o tratados con 15dPGJ2 previo a la infección de 48 h. Mediante ensayos inmunocitoquímicos de fluorescencia, utilizando un suero policlonal de conejo dirigido contra *T. cruzi* y un anticuerpo secundario conjugado a FITC, observamos que los miocardiocitos tratados con 15dPGJ2 presentan un mayor número de parásitos intracelulares respecto al parasitismo detectado en los miocardiocitos infectados y sin tratar, tal como se muestra en la figura 8.

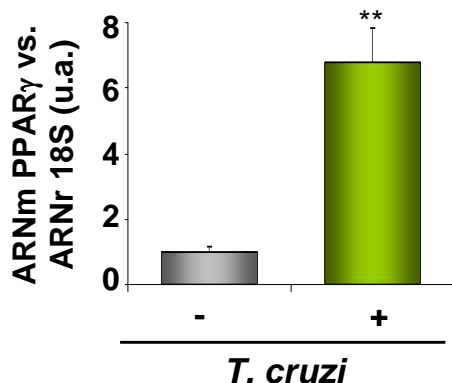


**Figura 8. 15dPGJ2 aumenta el parasitismo de miocardiocitos infectados con *T. cruzi*.** Los miocardiocitos fueron infectados con tripomastigotes de *T. cruzi* (relación 5:1 parásitos:células) o tratados con 15dPGJ2 (2 $\mu$ M) 30 min previo a la infección. Luego de 3 h, los cultivos fueron lavados para retirar los parásitos que no invadieron células y mantenidos durante 48 h. Para la inmunocitoquímica de fluorescencia las células fueron incubadas con suero inmune de conejo infectado con *T. cruzi* y luego con anti-IgG de conejo conjugado a FITC, observándose amastigotes intracelulares en verde y contra tinción de los miocardiocitos con azul de Evans. La intensidad de infección fue cuantificada integrando el área de fluorescencia, bajo el supuesto de que la densidad de pixeles es directamente proporcional al número de parásitos intracelulares, y los datos obtenidos fueron analizados con el programa ImageJ. El presente resultado corresponde a tres microfotografías representativas (400X). \*\* $p < 0,01$  vs. control; # $p < 0,05$  vs. *T. cruzi*.



### 3 Mecanismos dependientes de PPAR $\gamma$ en los efectos ejercidos por 15dPGJ2

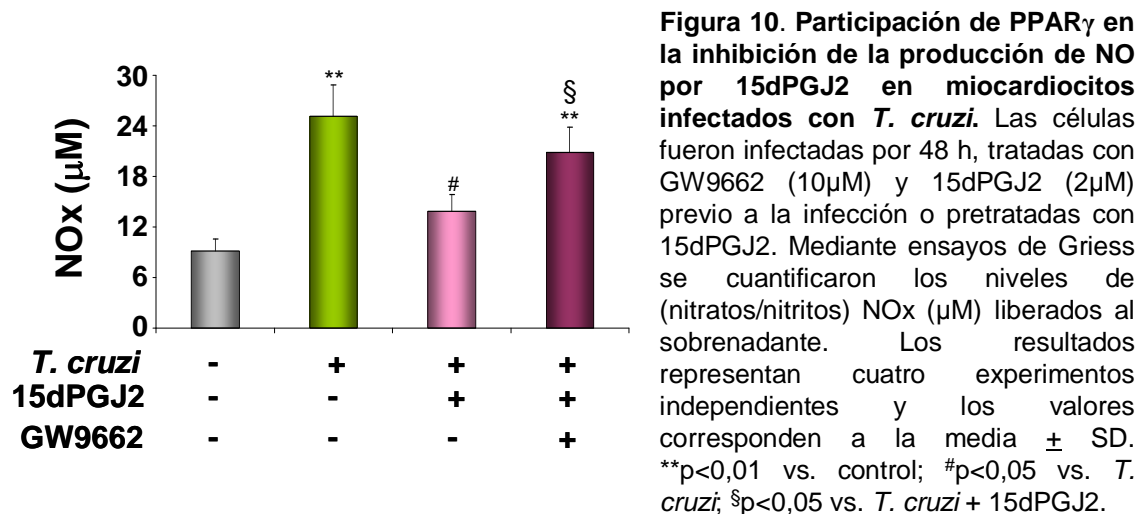
Ante las evidencias respecto a que 15dPGJ2 es un potente inhibidor de la respuesta inflamatoria inducida en miocardiocitos por la infección, decidimos analizar las posibles modificaciones en la expresión del receptor PPAR $\gamma$  frente a la infección con *T. cruzi*. Para ello, realizamos ensayos de Q-RT-PCR a partir de ARN total de miocardiocitos control o infectados con *T. cruzi* por 24 h y observamos que la infección aumenta los niveles de transcripción de PPAR $\gamma$  comparado con los valores cuantificados en miocardiocitos sin infectar (Fig. 9). Este resultado concuerda con resultados anteriores de nuestro grupo en los cuales detectamos aumentos en la expresión de PPAR $\alpha$  y PPAR $\gamma$  en macrófagos peritoneales provenientes de ratones infectados con la cepa letal RA y con una cepa no letal (K98) de *T. cruzi* (Tesina Marcela Vera. 2012). Asimismo, en un modelo *in vivo* reportamos aumentos en la expresión cardíaca de PPAR $\gamma$  frente a la infección con las cepas RA y K98 (Penas F. y col. 2012).



**Figura 9. Expresión del receptor nuclear PPAR $\gamma$  en miocardiocitos infectados con la cepa RA de *T. cruzi*.** Mediante Q-RT-PCR se cuantificaron los niveles de expresión de PPAR $\gamma$  en miocardiocitos control e infectados por 24 h. La expresión del ARNm, en unidades arbitrarias (u.a.), se representa como la cantidad de ARNm PPAR $\gamma$  relativa al control y normalizada con 18S. Los resultados representan tres experimentos independientes y los valores corresponden a la media  $\pm$  SD. \*\* $p < 0,01$  vs. control.

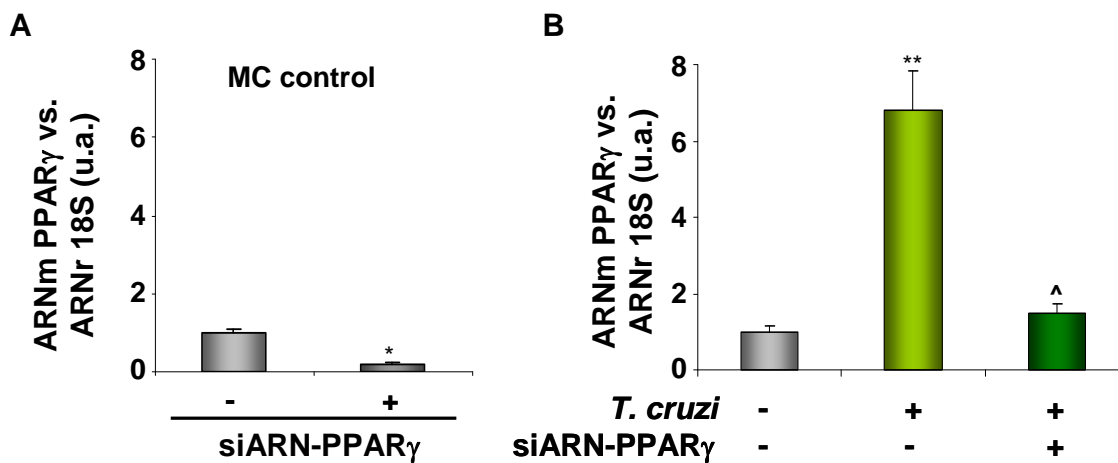
Ha sido descrito que 15dPGJ2 puede ejercer efectos antiinflamatorios involucrando mecanismos dependientes e independientes de la unión a su receptor PPAR $\gamma$ . Dado que estos mecanismos no han sido completamente esclarecidos, decidimos evaluar en primer lugar la participación de PPAR $\gamma$  en la inhibición de la respuesta inflamatoria por 15dPGJ2 en miocardiocitos infectados con *T. cruzi*. Como primer herramienta utilizamos un

antagonista farmacológico específico e irreversible de PPAR $\gamma$ , GW9662, y evaluamos la producción de NO en estas condiciones. Para ello, los miocardiocitos fueron incubados con GW9662 y tratados con 15dPGJ2 e infectados con *T. cruzi*. Al cabo de 48 h cuantificamos los niveles de NO en el sobrenadante y los comparamos con los valores de NO producidos por miocardiocitos infectados y con aquellos infectados y tratados con 15dPGJ2. En la figura 10 se observa que en presencia de GW9662 se revierte, al menos parcialmente, la inhibición ejercida por 15dPGJ2 determinando la participación de PPAR $\gamma$  en los efectos de este ligando. Se realizó un control con miocardiocitos tratados solamente con GW9662, en el cual no se detectó ninguna diferencia respecto al control. Además, al preincubar con GW9662 no se vió afectada la viabilidad de los miocardiocitos (determinada por tinción con azul tripán) (datos no mostrados).



Con el objeto de profundizar este estudio y confirmar la participación de este receptor nuclear en los efectos ejercidos por 15dPGJ2, decidimos silenciar PPAR $\gamma$  utilizando ARN de interferencia (siARN-PPAR $\gamma$ ). Se probaron distintos oligonucleótidos comerciales indicados como posibles inhibidores de la síntesis de PPAR $\gamma$ , en concentraciones crecientes (10–100 nM). Brevemente, la metodología consistió en transfección de los miocardiocitos con cada uno de los oligonucleótidos durante 48 y 72 h, al cabo de las cuales se extrajo ARN total de las células cardíacas y se analizó la

eficiencia del silenciamiento del ARNm de PPAR $\gamma$ . Los ensayos de Q-RT-PCR revelaron que 72 h de incubación con 50 nM del oligonucleótido 207864 fueron las condiciones óptimas para producir el máximo silenciamiento (Fig. 11A). Además, mediante el mismo procedimiento evaluamos la eficacia del silenciamiento en los miocardiocitos infectados con *T. cruzi*. La figura 11B revela que el aumento en la transcripción del ARNm de PPAR $\gamma$  inducida por *T. cruzi* resulta impedido en miocardiocitos transfectados con el siARN-PPAR $\gamma$ .

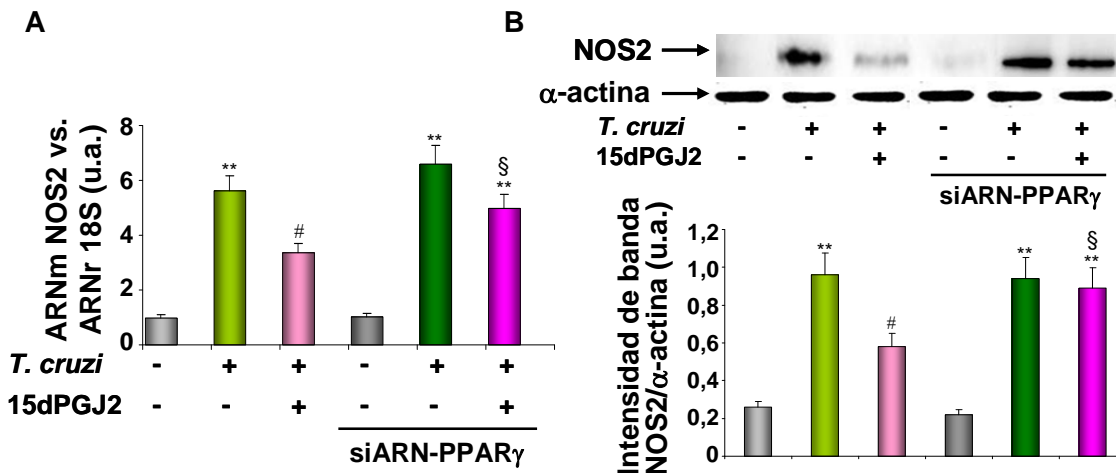


**Figura 11. Expresión del receptor nuclear PPAR $\gamma$  en miocardiocitos transfectados con ARN de interferencia.** Mediante Q-RT-PCR se cuantificaron los niveles de transcripción de PPAR $\gamma$  en miocardiocitos (MC) transfectados con siARN-PPAR $\gamma$  control (A) o infectados con *T. cruzi* por 24 h (B). La expresión del ARNm, en unidades arbitrarias (u.a.), se representa como la cantidad de ARNm de PPAR $\gamma$  relativa a los respectivos controles y normalizada con 18S. Los resultados representan tres experimentos independientes, y los valores corresponden a la media  $\pm$  SD. \*\*p<0,01 vs. control; \*p<0,05 vs. control; ^p<0,01 vs. *T. cruzi*.

### 3.1 Participación de PPAR $\gamma$ en la inhibición de NOS2 por 15dPGJ2

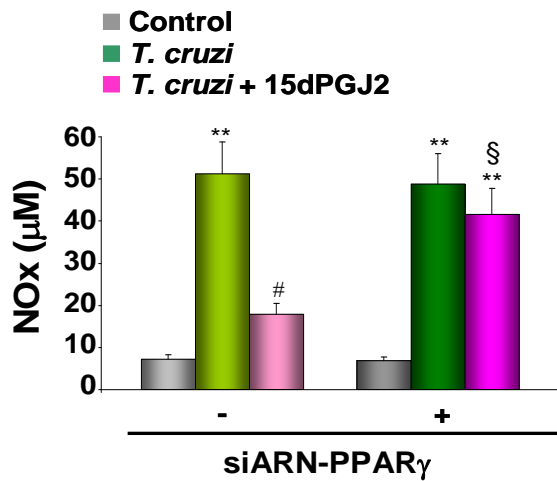
En primera instancia, y una vez comprobada la eficacia del silenciamiento de PPAR $\gamma$  en nuestro modelo de infección, nos preguntamos si el efecto inhibitorio de 15dPGJ2 sobre la expresión de NOS2 observado anteriormente es mediado completamente a través de PPAR $\gamma$ . Para ello, los miocardiocitos fueron transfectados con el siARN-PPAR $\gamma$ , tratados con 15dPGJ2 e infectados con *T. cruzi* por 48 h y se evaluó la expresión de NOS2 por Q-RT-PCR (Fig. 12A) y por Wb (Fig. 12B). Como se observa, 15dPGJ2 no fue

capaz de inhibir la expresión de NOS2 a nivel transcripcional ni de proteína en las células transfectadas con el ARN de interferencia para PPAR $\gamma$ , indicando la participación del receptor en los efectos ejercidos por 15dPGJ2.



**Figura 12. Participación de PPAR $\gamma$  en la inhibición de NOS2 ejercida por 15dPGJ2.** Los miocardiocitos fueron transfectados con siARN-PPAR $\gamma$ , tratados con 15dPGJ2 (2 $\mu$ M) e infectados con *T. cruzi* o transfectados e infectados con *T. cruzi* y se evaluaron los niveles de transcripción del ARNm de NOS2 por Q-RT-PCR (A) y de proteína mediante Wb (B). En A, la expresión del ARNm, en unidades arbitrarias (u.a.), representa la cantidad de ARNm de NOS2 relativa al control y normalizada con 18S. Los resultados representan tres experimentos independientes. En B, los resultados son representativos de tres experimentos independientes y se utilizó un anticuerpo anti  $\alpha$ -actina para normalizar. Los valores corresponden a la media  $\pm$  SD. \*\*p<0,01 vs. control; #p<0,05 vs. *T. cruzi*; §p<0,05 vs. *T. cruzi* + 15dPGJ2.

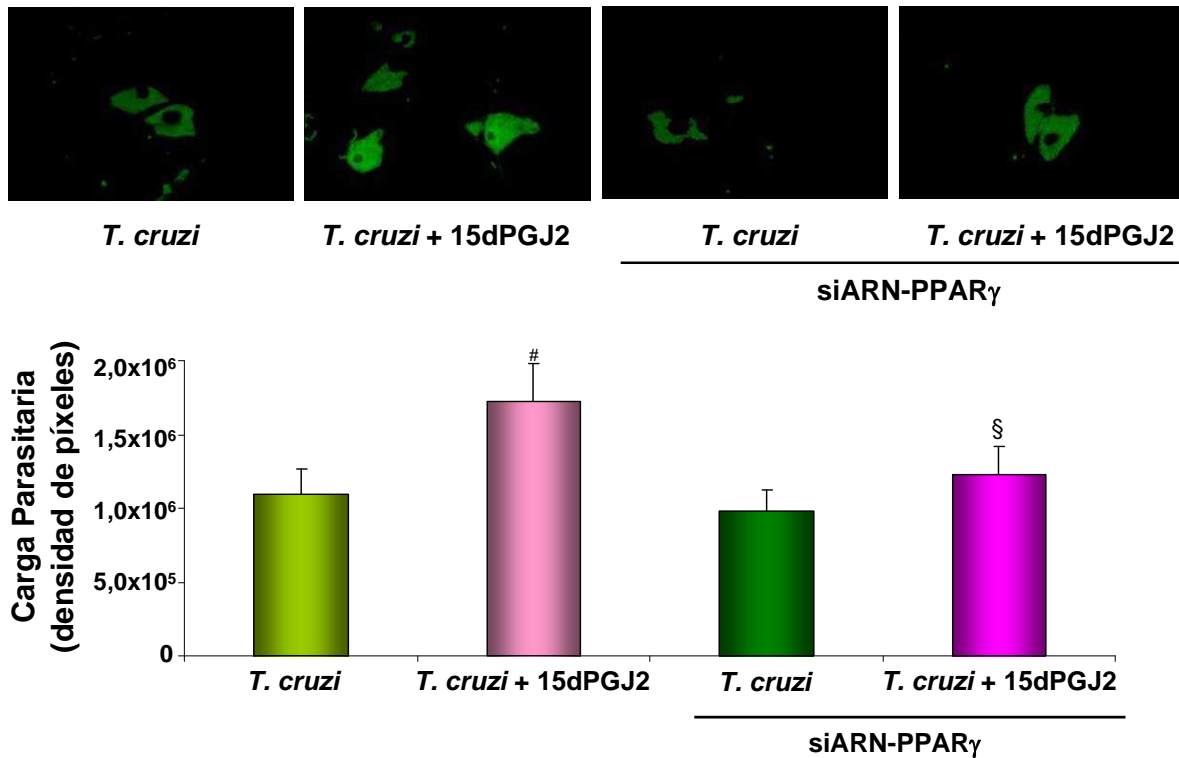
El paso siguiente fue evaluar la participación de PPAR $\gamma$  en la inhibición de la actividad de NOS2 ejercida por 15dPGJ2. Para ello se cuantificaron los nitritos/nitratos acumulados en el sobrenadante celular luego de silenciar la expresión de PPAR $\gamma$  e infectar los miocardiocitos. La figura 13 muestra claramente que el silenciamiento de PPAR $\gamma$  impide el efecto modulador de 15dPGJ2 sobre la producción de NO inducida por la infección con *T. cruzi*, confirmando la participación del receptor de 15dPGJ2 en las acciones inhibitorias ejercidas por esta prostaglandina sobre NOS2.



**Figura 13. PPAR $\gamma$  media los efectos inhibitorios de 15dPGJ2 sobre la síntesis de NO.** Los miocardiocitos fueron transfectados con siARN-PPAR $\gamma$  y tratados con 15dPGJ2 (2µM) e infectados con *T. cruzi* o infectados con *T. cruzi* y tratados con 15dPGJ2 y se determinó la acumulación de (nitritos/nitratos) NOx (µM) a las 72 h post infección mediante ensayos de Griess. Los resultados representan cinco experimentos independientes y los valores corresponden a la media  $\pm$  SD. \*\*p<0,01 vs. control; #p<0,05 vs. *T. cruzi*; §p<0,05 vs. *T. cruzi* + 15dPGJ2.

### 3.2 15dPGJ2 modula el parasitismo de manera dependiente de PPAR $\gamma$

El siguiente objetivo consistió en investigar si el aumento del parasitismo inducido por 15dPGJ2 era un efecto mediado por PPAR $\gamma$ . Mediante análisis inmunocitoquímicos determinamos que los miocardiocitos transfectados con siARN-PPAR $\gamma$ , tratados con 15dPGJ2 e infectados con *T. cruzi* presentan un menor número de parásitos que las células infectadas y tratadas con el agonista de PPAR $\gamma$  (Fig. 14). Este resultado confirma la participación de PPAR $\gamma$  en la modulación del parasitismo por 15dPGJ2.

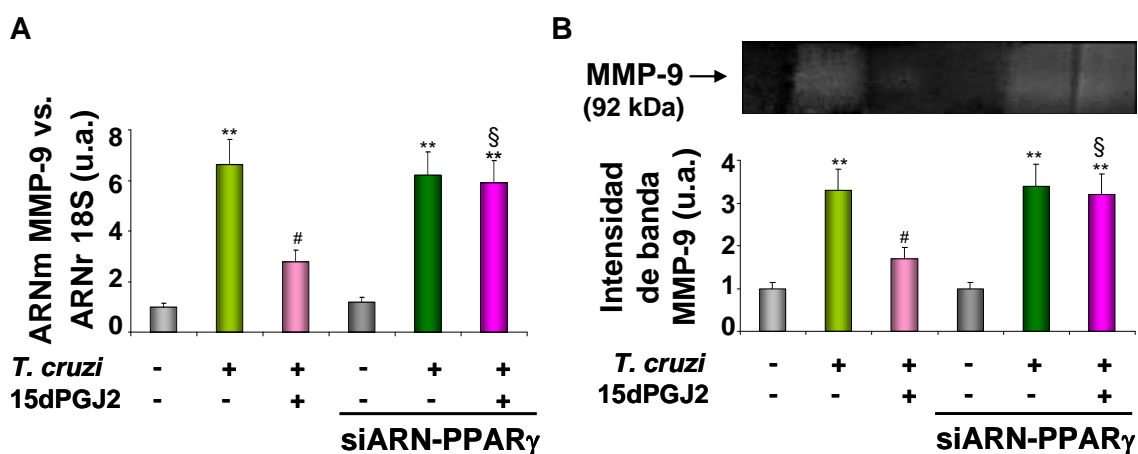


**Figura 14. Modulación del parasitismo por 15dPGJ2 a través de PPAR $\gamma$ .** Los miocardiocitos fueron crecidos sobre portaobjetos hasta 40% de confluencia e infectados o sometidos a distintos pretratamientos: 15dPGJ2 (2 $\mu$ M) o siARN-PPAR $\gamma$  y 15dPGJ2. Al cabo de 72 h se realizaron análisis inmunocitoquímicos con suero inmune de conejo infectado con *T. cruzi* y luego con anticuerpo secundario conjugado a FITC, observándose amastigotes intracelulares en verde. Las microfotografías (400x) son representativas de tres experimentos independientes. El gráfico representa las medias  $\pm$  SD de cargas parasitarias como densidad de píxeles integrada, para cada tratamiento. #p<0,05 vs. *T. cruzi*; \$p<0,05 vs. *T. cruzi* + 15dPGJ2.

### 3.3 Mecanismos dependientes de PPAR $\gamma$ en la inhibición de MMPs por 15dPGJ2

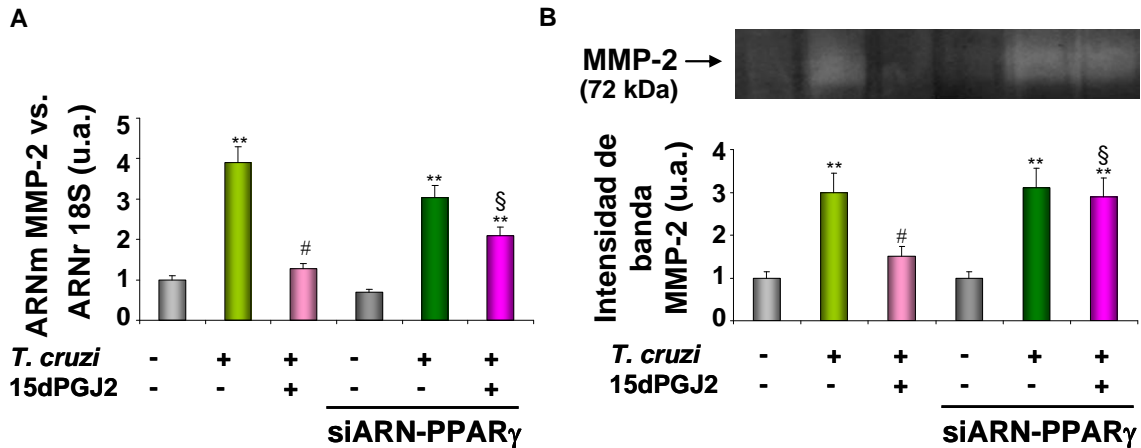
Con el objetivo de determinar si la acción inhibitoria de 15dPGJ2 sobre MMP-9 y MMP-2 es mediada por su receptor, decidimos silenciar PPAR $\gamma$  en miocardiocitos infectados con *T. cruzi* y tratados con 15dPGJ2 y evaluar, en primer lugar, la expresión y actividad de MMP-9. La figura 15A muestra que el silenciamiento de PPAR $\gamma$  impide los efectos inhibitorios de 15dPGJ2 sobre la transcripción de MMP-9, analizada mediante ensayos de Q-RT-PCR. Más aún, analizamos si la inhibición ejercida por 15dPGJ2 sobre la actividad de esta enzima también ocurre a través de PPAR $\gamma$ . Para ello, comparamos la

actividad gelatinolítica de MMP-9, mediante ensayos de zimografía, en los sobrenadantes de miocardiocitos infectados por 72 h con *T. cruzi* y tratados con 15dPGJ2 o transfectados con el siARN-PPAR $\gamma$ . Observamos que el silenciamiento de PPAR $\gamma$  impidió el efecto inhibitorio de 15dPGJ2 (Fig. 15B).



**Figura 15. Participación de PPAR $\gamma$  en la inhibición de MMP-9 ejercida por 15dPGJ2 en miocardiocitos infectados con *T. cruzi*.** (A) Las células cardíacas fueron transfectadas con siARN-PPAR $\gamma$  y tratadas con 15dPGJ2 (2  $\mu$ M) previo a la infección o tratadas con 15dPGJ2 e infectadas. Al cabo de 48 h se extrajo ARN total y mediante Q-RT-PCR se cuantificaron los niveles de transcripción del ARNm de MMP-9. (B) La actividad de MMP-9 fue evaluada bajo las mismas condiciones que en A, mediante ensayos de zimografía. En A, la expresión de los ARNm, en unidades arbitrarias (u.a.), se representa como la cantidad de ARNm de MMP-9 relativa al tiempo 0 y normalizada con 18S. Los resultados muestran un experimento representativo de tres realizados y los valores corresponden a la media  $\pm$  SD. En B los valores están representados respecto al control en (u.a.) y los resultados son representativos de tres experimentos independientes. \*\*p<0,01 vs. control; #p<0,05 vs. *T. cruzi*; §p<0,05 vs. *T. cruzi* + 15dPGJ2.

A partir de este resultado estudiamos la participación de PPAR $\gamma$  en los efectos inhibitorios de 15dPGJ2 sobre la expresión y actividad de MMP-2. La figura 16 muestra que, en presencia de siARN-PPAR $\gamma$ , 15dPGJ2 tampoco pudo ejercer sus efectos inhibitorios sobre MMP-2 ya que se observa recuperación de los niveles del ARNm y de la actividad gelatinolítica de esta enzima.



**Figura 16. PPAR $\gamma$  participa en la inhibición de MMP-2 ejercida por 15dPGJ2 en miocardiocitos infectados con *T. cruzi*.** (A) Las células cardíacas fueron transfectadas con siARN-PPAR $\gamma$  previo a la infección con *T. cruzi* o transfectadas, tratadas con 15dPGJ2 e infectadas. Al cabo de 48 h se extrajo ARN total y mediante Q-RT-PCR se cuantificaron los niveles de transcripción del ARNm de MMP-2. (B) La actividad de MMP-2 fue evaluada bajo las mismas condiciones que en A, en sobrenadantes obtenidos a las 72 h post infección mediante ensayos de zimografía. En A, la expresión de los ARNm, en unidades arbitrarias (u.a.), se representa como la cantidad de ARNm de MMP-2 relativa al tiempo 0 y normalizada con 18S. Los resultados muestran un experimento representativo de tres realizados y los valores corresponden a la media  $\pm$  SD. En B los valores están representados respecto al control en (u.a.) y los resultados son representativos de tres experimentos independientes. \*\* $p < 0,01$  vs. control; # $p < 0,05$  vs. *T. cruzi*; § $p < 0,05$  vs. *T. cruzi* + 15dPGJ2.

Los resultados obtenidos en los ensayos de silenciamiento de PPAR $\gamma$  demuestran que las acciones inhibitorias mediadas por 15dPGJ2 tanto sobre la transcripción y actividad de NOS, MMP-9 y MMP-2 así como el aumento del parasitismo son ejercidos a través de su receptor nuclear PPAR $\gamma$ .

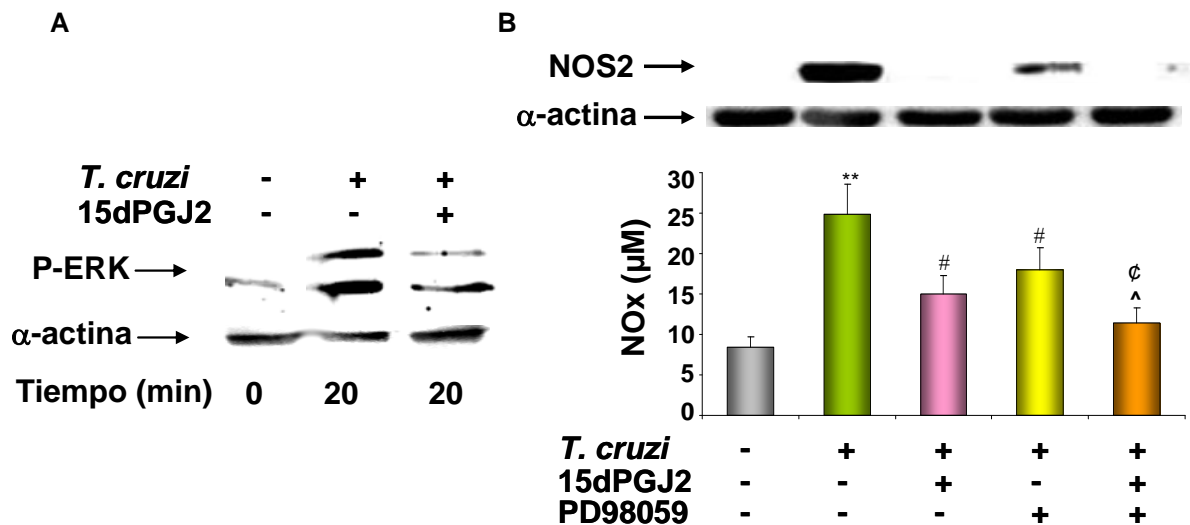


#### **4 Participación de mecanismos independientes de PPAR $\gamma$ en los efectos ejercidos por 15dPGJ2 en miocardiocitos infectados con *T. cruzi*.**

Si bien en numerosos trabajos se demuestra que los efectos antiinflamatorios de 15dPGJ2 son ejercidos a través de su receptor PPAR $\gamma$ , muchas de las acciones ejercidas por esta prostaglandina dependen de mecanismos alternativos, que actualmente siguen siendo objeto de estudio. En un trabajo de nuestro grupo realizado en un modelo de shock séptico donde cultivos primarios de miocardiocitos fueron estimulados con LPS y tratados con 15dPGJ2 reportamos que p38-MAPK participa en los efectos antiinflamatorios de 15dPGJ2 (Hovsepian E. y col. 2010).

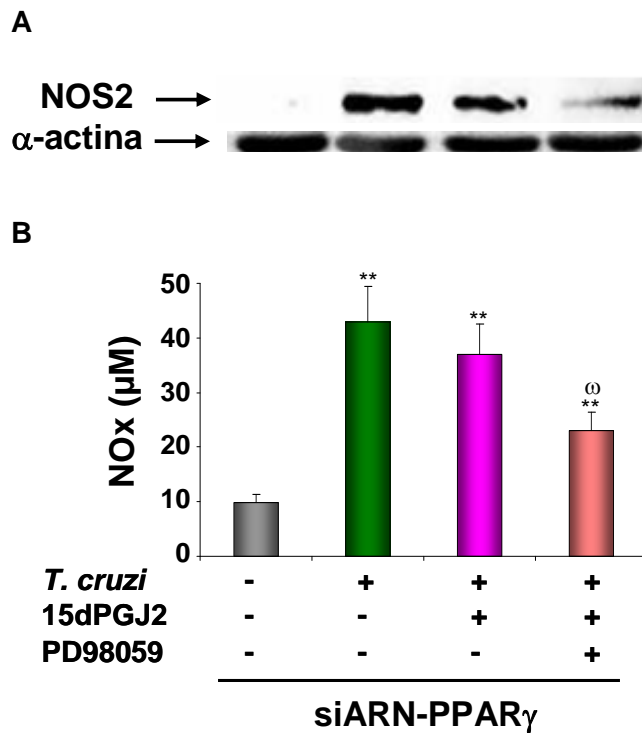
##### **4.1 Inhibición de ERK1/2**

De acuerdo a estos antecedentes, en este trabajo evaluamos la activación de MAPK en los miocardiocitos infectados con *T. cruzi* y los efectos de 15dPGJ2 sobre esta vía. En primer lugar se realizaron ensayos de Wb a partir de extractos citosólicos y utilizamos un anticuerpo que reconoce la forma fosforilada de ERK1/2. Pudimos evidenciar que la infección con *T. cruzi* induce la activación de esta vía a los 20 min de infección. Al preincubar los miocardiocitos con 15dPGJ2 comprobamos que este ligando inhibe dicha activación (Fig. 17A). Asimismo, en presencia de un inhibidor específico de la vía de ERK1/2, denominado PD98059, evaluamos la expresión de NOS2 y la producción de NO como una medida de la respuesta inflamatoria generada. La figura 17B muestra que PD98059 inhibe la expresión de NOS2 y la liberación de NO inducidos a las 48 h de infección con *T. cruzi* demostrando que, al menos en parte, la expresión y activación de esta enzima dependen de ERK1/2. No obstante, cuando los miocardiocitos infectados e incubados con PD98059 fueron tratados con 15dPGJ2, la inhibición en la expresión de NOS2 y en los niveles de NO llegaron a niveles prácticamente basales sugiriendo que además de ERK1/2, otra vía estaría implicada en los efectos ejercidos por 15dPGJ2. Se realizó un control con miocardiocitos tratados solamente con PD98059, en el cual no se detectó ninguna diferencia respecto al control. Además, este tratamiento no afectó la viabilidad de los miocardiocitos (determinada por tinción con azul tripán) (datos no mostrados).



**Figura 17. Participación de ERK1/2 en la modulación de NOS2 por 15dPGJ2.** (A) Los miocardiocitos fueron infectados por 20 min con *T. cruzi* o pretratados con 15dPGJ2 (2μM) y mediante ensayos de Wb se evaluó la fosforilación de ERK1/2. (B) Las células fueron tratadas con un inhibidor de la activación de ERK1/2, PD98059 (50μM), por 40 min e infectados con *T. cruzi* o tratados además con 15dPGJ2 (2μM). Mediante Wb se evaluó la expresión de NOS2 48 h post infección. La actividad de esta enzima fue analizada a través de ensayos de Griess en los cuales se determinó la acumulación de (nitritos/nitratos) NOx (μM) a las 48 h post infección. Los resultados representan tres experimentos independientes y los valores corresponden a la media ± SD. En A y B, se utilizó un anticuerpo contra α-actina para normalizar. \*\*p<0,01 vs. control; #p<0,05 vs. *T. cruzi*; ^p<0,01 vs. *T. cruzi*; ¢p<0,05 vs. *T. cruzi* + PD98059.

Para profundizar el estudio de la participación de vías independientes a PPARγ en los efectos ejercidos por 15dPGJ2, el siguiente paso fue transfectar con ARN de interferencia para PPARγ a miocardiocitos infectados con *T. cruzi* y tratados tanto con 15dPGJ2 como con PD98059. Evaluamos nuevamente la expresión y actividad de NOS2 y sorprendentemente observamos que, una vez silenciado PPARγ e inhibido ERK1/2, 15dPGJ2 aún puede ejercer un efecto modulador sobre la expresión de NOS2 y la producción de NO (Fig. 18). Esto nos confirmaría que además de ERK1/2 y PPARγ, otra vía debería estar implicada en los efectos ejercidos por 15dPGJ2.



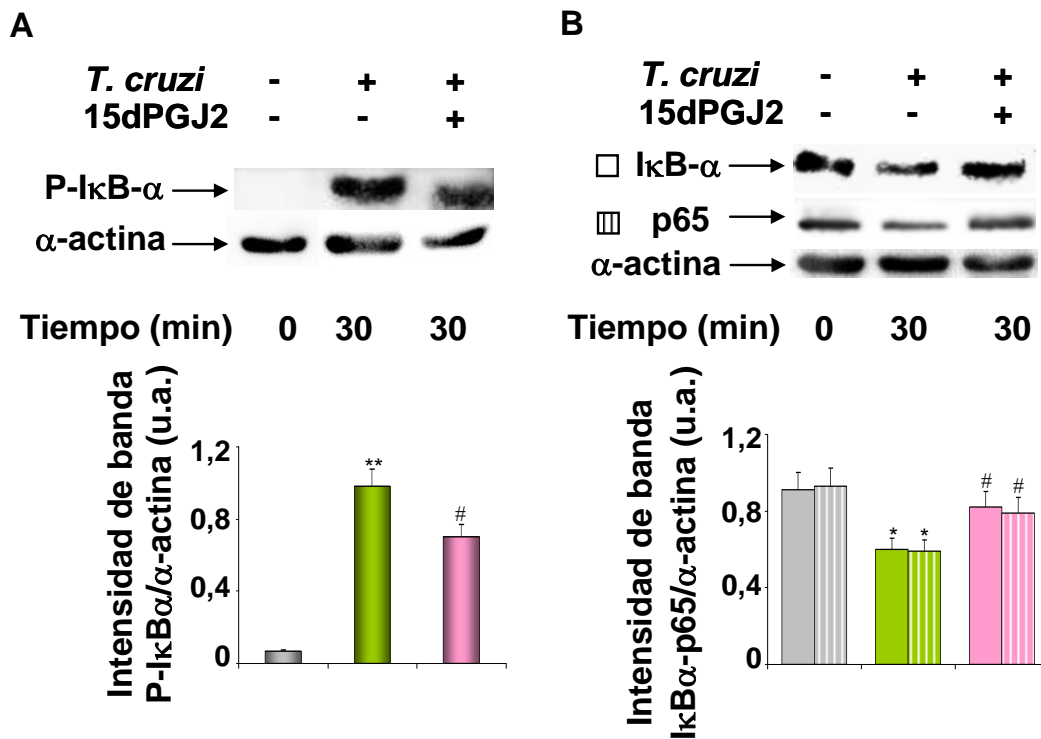
**Figura 18. ERK1/2 y PPAR $\gamma$  participan en la inhibición de NOS2 por 15dPGJ2.** (A) Los miocardiocitos fueron transfectados con siARN-PPAR $\gamma$  e infectados con *T. cruzi* o tratados además con 15dPGJ2 (2 $\mu$ M) o con 15dPGJ2 y PD98059 (50 $\mu$ M). Al cabo de 48 h se realizaron ensayos de Wb para evaluar la expresión de NOS2 (B) Mediante ensayos de Griess se analizó la actividad de esta enzima determinando la acumulación de (nitritos/nitratos) NOx ( $\mu$ M) en el sobrenadante 72 h post infección. En A, se utilizó un anticuerpo contra  $\alpha$ -actina para normalizar. Los resultados son representativos de tres experimentos independientes. Para B, los resultados representan tres experimentos independientes y los valores corresponden a la media  $\pm$  SD. \*\*p<0,01 vs. control; <sup>o</sup>p<0,05 vs. *T. cruzi* + 15dPGJ2 + siARN-PPAR $\gamma$ .

#### 4.2 Inhibición de NF- $\kappa$ B

Otro de los mecanismos descritos ampliamente en la bibliografía que explica el comportamiento antiinflamatorio de 15dPGJ2, involucra inhibición de la vía de NF- $\kappa$ B. Castrillo y col. (2000) y Rossi A. y col. (2000) demostraron en modelos *in vitro* que 15dPGJ2 es capaz de regular la activación de la quinasa IKK, impidiendo así la degradación del inhibidor I $\kappa$ B y por ende, la activación de NF- $\kappa$ B. Además de actuar directamente sobre la fosforilación de IKK, 15dPGJ2 es capaz de impedir la unión de NF- $\kappa$ B a su secuencia específica de ADN por modificación de residuos de cisteína localizados en el dominio Rel. En este caso, los residuos C<sup>38</sup> en p65 y C<sup>62</sup> en p50 constituyen otra diana de acción de 15dPGJ2 (Straus DS. y col. 2000). Asimismo, en el año 2010 en un trabajo de nuestro grupo, revelamos en un modelo de miocardiocitos estimulados con LPS que 15dPGJ2 puede actuar a través de la vía de NF- $\kappa$ B (Hovsepian E. y col. 2010). A partir de estos antecedentes, decidimos investigar en nuestro modelo de infección aguda

de miocardiocitos con *T. cruzi* si la vía de NF- $\kappa$ B está implicada en los efectos inhibitorios de 15dPGJ2 sobre la respuesta inflamatoria.

Para responder esta incógnita, evaluamos la activación de la cascada de señalización de NF- $\kappa$ B en los miocardiocitos infectados con *T. cruzi* y los posibles efectos ejercidos por 15dPGJ2. Para ello, obtuvimos extractos citosólicos de miocardiocitos infectados por 30 min o infectados y pretratados con 15dPGJ2 y evaluamos la activación de NF- $\kappa$ B mediante ensayos de Wb. Dado que uno de los primeros eventos que pueden visualizarse al activarse la vía de NF- $\kappa$ B es la fosforilación de su inhibidor I $\kappa$ B- $\alpha$ , los extractos citosólicos fueron incubados con un anticuerpo que reconoce específicamente la forma fosforilada del inhibidor. Como se observa en la figura 19A, la infección con *T. cruzi* induce fosforilación de la proteína inhibitoria I $\kappa$ B- $\alpha$  mientras que 15dPGJ2 inhibe dicha fosforilación. Comprobamos la activación de esta vía evaluando la degradación citoplasmática de I $\kappa$ B- $\alpha$  en los miocardiocitos infectados respecto a los controles no infectados. También observamos que los miocardiocitos infectados y pretratados con 15dPGJ2 muestran niveles de expresión de I $\kappa$ B- $\alpha$  semejantes al control no infectado, indicando menor activación de NF- $\kappa$ B respecto a la inducida por la infección. Además, analizamos los niveles de expresión de la subunidad p65 de NF- $\kappa$ B en el citosol celular. Observamos que la infección con *T. cruzi* promueve la entrada al núcleo y por consiguiente su desaparición citosólica, mientras que la incubación con 15dPGJ2 retiene a esta proteína en el citosol (Fig. 19B). Podemos concluir que 15dPGJ2 inhibe la activación de la vía de NF- $\kappa$ B inducida por la infección ya que en los miocardiocitos tratados con el ligando de PPAR $\gamma$  se detectan menores niveles de I $\kappa$ B- $\alpha$  fosforilada así como menores niveles de degradación de este inhibidor y mayor presencia de la subunidad p65 en citosol. Estos resultados sugieren que 15dPGJ2 ejercería su efecto antiinflamatorio, al menos en parte, a través de esta vía de señalización.

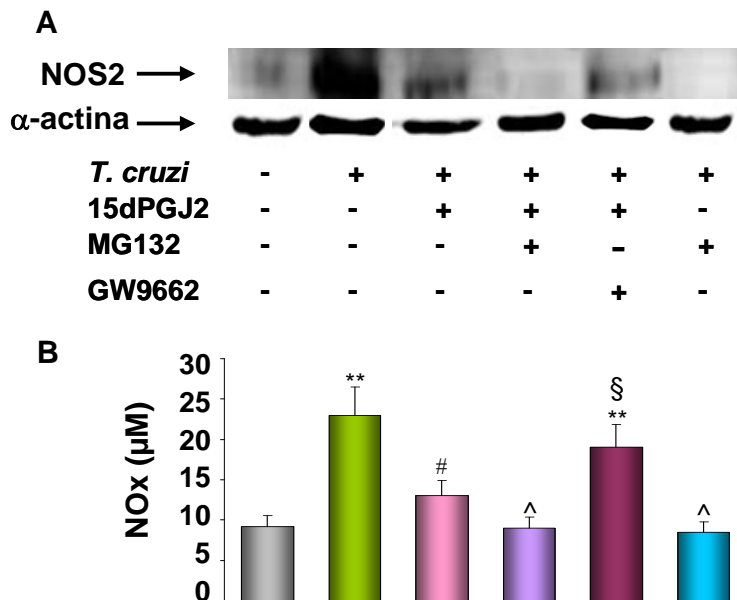


**Figura 19. Efecto de 15dPGJ2 sobre la activación de NF-κB en miocardiocitos infectados con *T. cruzi*.** Mediante Wb se analizó la activación de la vía de NF-κB a partir de extractos proteicos citosólicos en miocardiocitos infectados con *T. cruzi* o pretratados con 15dPGJ2 (2μM). (A) Se utilizó un anticuerpo específico para la detección de la proteína IκB-α fosforilada. (B) Se analizó la expresión de IκB-α total y p65. Para A y B, los resultados son representativos de tres experimentos independientes y los valores corresponden a la media ± SD. Se utilizó un anticuerpo anti α-actina para normalizar. \*\*p<0,01 vs. control; \*p<0,05 vs. control; #p<0,05 vs. *T. cruzi*.

Como es sabido, una vez que IκB-α es fosforilado y ubiquitinizado, es degradado por el proteosoma permitiendo así la liberación de p65 y su ingreso al núcleo donde se une a las zonas promotoras de sus genes diana. Por ello, y para profundizar aún más nuestro estudio sobre la participación de NF-κB, utilizamos un inhibidor del proteosoma, MG132, que impide que IκB-α pueda ser degradado y por lo tanto que p65 pueda translocarse al núcleo y promover así la expresión de genes. Decidimos evaluar el papel de MG132 sobre la expresión y actividad de NOS2 inducida por la infección con *T. cruzi*. En primer

lugar comprobamos que la activación de NF-κB induce la expresión de NOS2 y que la inhibición de esta vía con MG132 impide a su vez la expresión y actividad de esta enzima inducida por la infección (Fig. 20A). Se realizó un control con miocardiocitos tratados solamente con MG132, en el cual no se detectó ninguna diferencia respecto al control, y el tratamiento tampoco afectó la viabilidad de los miocardiocitos (determinada por tinción con azul tripán) (datos no mostrados).

Para avanzar en el estudio de los mecanismos dependientes o independientes de PPAR $\gamma$ , a través de los cuales 15dPGJ2 ejerce sus efectos, analizamos la expresión y actividad de NOS2 en presencia de MG132 o de GW9662, antagonista específico de PPAR $\gamma$ . Los resultados obtenidos en la figura 20 confirman una vez más que tanto NF-κB como PPAR $\gamma$  participan en los efectos inhibitorios de 15dPGJ2 sobre la expresión y actividad de NOS2 en miocardiocitos infectados con *T. cruzi*.



**Figura 20. NF-κB y PPAR $\gamma$  participan de los efectos inhibitorios sobre NOS2 ejercidos por 15dPGJ2 en miocardiocitos infectados con *T. cruzi*.** (A) Los miocardiocitos fueron infectados por 48 h, pretratados con 15dPGJ2 (2µM), MG132 (20µM) y/o con GW9662 (10µM) para evaluar mediante ensayos de Wb la expresión de NOS2. (B) En las mismas condiciones que en A, se analizó la actividad de esta enzima mediante ensayos de Griess en los cuales se determinó la acumulación de (nitritos/nitratos) NOx (µM) en los sobrenadantes celulares a las 48 h post infección. En A, se utilizó un anticuerpo contra α-actina para normalizar. Los resultados son representativos de tres experimentos independientes. Para B, los resultados representan tres experimentos independientes y los valores corresponden a la media  $\pm$  SD. \*\*p<0,01 vs. control; #p<0,05 vs. *T. cruzi*; ^p<0,01 vs. *T. cruzi*; §p<0,05 vs. *T. cruzi* + 15dPGJ2.

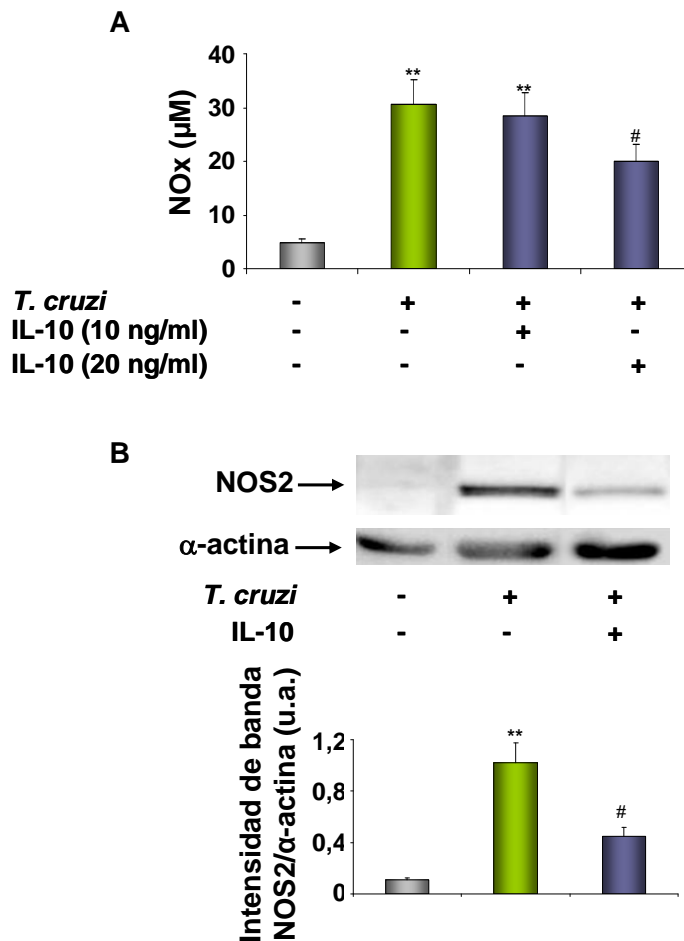
### **PARTE 3: Efectos de IL-10 frente a la infección con *T. cruzi***

#### **1 IL-10 regula mediadores inflamatorios en miocardiocitos infectados con *T. cruzi***

Dado que IL-10 es una de las principales citoquinas antiinflamatorias cuyo propósito es limitar la inducción de una gran variedad de mediadores proinflamatorios, nos hemos propuesto estudiar el papel de IL-10 en la resolución de la respuesta inflamatoria cardíaca generada por la infección con *T. cruzi*. En primera instancia nos propusimos determinar los niveles de expresión de IL-10 endógena en los miocardiocitos frente a la infección con *T. cruzi*. Su expresión a nivel transcripcional fue evaluada mediante ensayos de Q-RT-PCR y por inmunoabsorción ligado a enzimas (ELISA) sin poder detectar niveles significativos de esta citoquina ni en los controles ni en las células infectadas (datos no mostrados). Estos resultados concuerdan con lo descrito en un trabajo publicado recientemente, en el cual no se detectó producción significativa de IL-10 en miocardiocitos infectados con la cepa Tulahuen de *T. cruzi* (Ponce NE. y col. 2012). A la luz de estos resultados, nos propusimos evaluar en cultivos primarios de miocardiocitos infectados con *T. cruzi*, los efectos de la adición exógena de IL-10 así como los mecanismos y vías de señalización utilizadas por esta citoquina, como un paso inicial en beneficio de la recuperación de la funcionalidad cardíaca en la enfermedad de Chagas.

##### **1.1 Modulación de la expresión y actividad de NOS2 por IL-10**

En primer lugar evaluamos la respuesta de las células cardíacas infectadas frente a distintas concentraciones de IL-10 (10 y 20 ng/ml) las cuales, según datos bibliográficos, poseen efectos beneficiosos en modelos de shock endotóxico por LPS (Shibata Y. y col. 1998) y estrés oxidativo (Kaur K. y col. 2006). Pudimos observar mediante ensayos de Griess que 20 ng/ml de IL-10 resultó la concentración óptima para reducir de manera significativa la producción de NO en miocardiocitos a las 48 h posteriores a la infección (Fig. 21A). Además de modular la producción de este mediador inflamatorio, IL-10 también inhibe la expresión de NOS2, evaluado mediante ensayos de Wb a partir de extractos proteicos totales de miocardiocitos pretratados con 20 ng/ml de IL-10 e infectados con *T. cruzi* por 48 h (Fig. 21B).

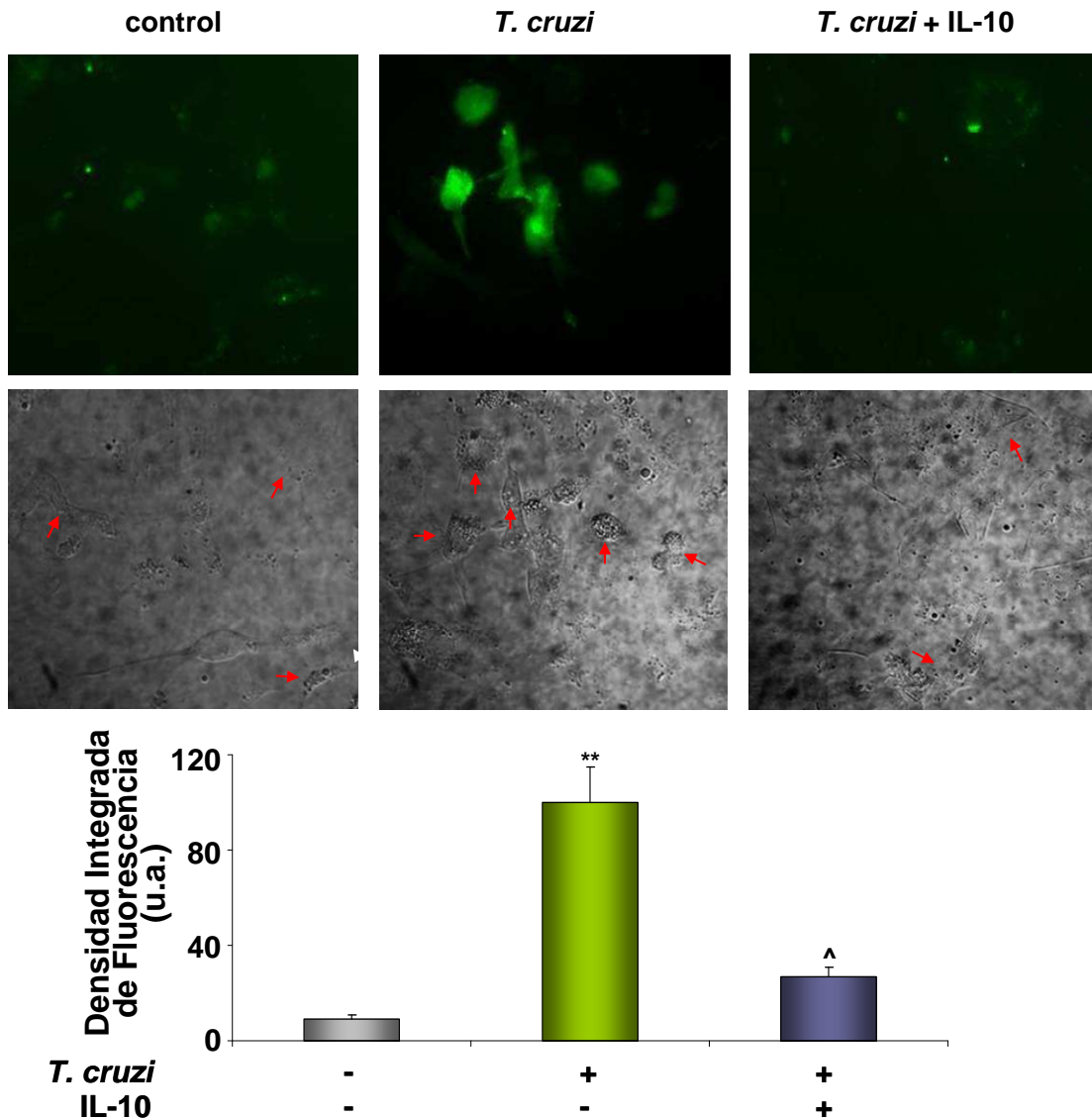


**Figura 21. IL-10 Inhibe la expresión y actividad de NOS2 en miocardiocitos infectados con *T. cruzi*.** (A) Las células en cultivo fueron tratadas con 10 ng/ml o 20 ng/ml de IL-10 15 min previo a la infección con *T. cruzi*. Al cabo de 48 h se cuantificó la acumulación de (nitritos/nitratos) NOx (µM) mediante ensayos de Griess. (B) Se evaluó la expresión de NOS2 por Wb en miocardiocitos infectados o pretratados con 20 ng/ml de IL-10, utilizando anticuerpo contra α-actina para normalizar. Para A, los resultados representan la media ± SD de seis experimentos independientes. En B, los resultados son representativos de tres experimentos independientes. Los valores corresponden a la media ± SD. \*\*p<0,01 vs. control; #p<0,05 vs. *T. cruzi*.

Además, evaluamos la síntesis de NO *in situ* mediante la utilización de 4-amino-5-metilamino-2',7'-difluorofluoresceína (DAF-FM), un indicador altamente sensible de la presencia de NO. Este reactivo es virtualmente no fluorescente hasta que reacciona con el NO formando benzotriazol fluorescente. En la figura 22 podemos observar una intensa



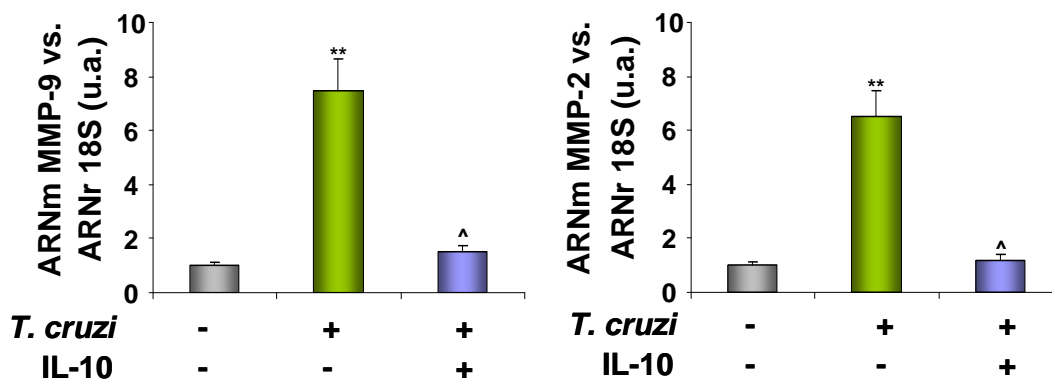
fluorescencia en los miocardiocitos infectados por 48 h con *T. cruzi* mientras que en aquellos tratados con IL-10 la marca fluorescente desaparece, indicando una clara inhibición en la producción de NO.



**Figura 22. IL-10 inhibe la síntesis de NO en miocardiocitos infectados con *T. cruzi*.** Las células fueron cultivadas sobre portaobjetos redondos de cristal e infectados con *T. cruzi* o pre tratados con IL-10 (20 ng/ml) por 15 min. Se detectó la presencia de NO utilizando el reactivo fluorescente DAF-FM, visualizado mediante microscopía de fluorescencia. Las fotografías del panel de arriba fueron obtenidas colocando el filtro adecuado y las del panel de abajo fueron tomadas en contraste de fases. Las flechas rojas señalan las células en las que se observó reacción positiva. Las microfotografías (400x) son representativas de tres experimentos independientes. El gráfico representa las medias  $\pm$  SD de la densidad de integrada de fluorescencia. \*\* $p < 0,01$  vs. control; ^ $p < 0,01$  vs. *T. cruzi*.

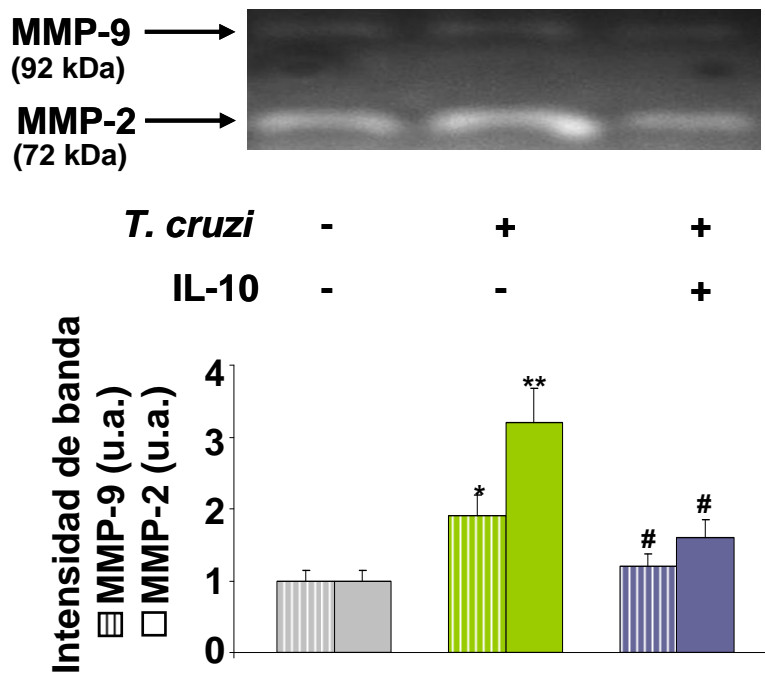
### 1.2 Efecto de IL-10 sobre la expresión y actividad de MMPs

A partir de estos resultados, quisimos investigar si IL-10 también ejerce algún efecto sobre la expresión de MMPs inducidas por la infección de los miocardiocitos con *T. cruzi*. Para ello, evaluamos mediante Q-RT-PCR los niveles de transcripción de MMP-9 y MMP-2 en los miocardiocitos infectados y tratados con IL-10. En la figura 23 se puede observar que IL-10 (20 ng/ml) inhibe la transcripción de ambas MMPs, de manera significativa, a las 48 h respecto a la inducida por la infección con *T. cruzi*.



**Figura 23. IL-10 inhibe la expresión de MMP-9 y MMP-2 inducida por la infección de los miocardiocitos con *T. cruzi*.** Los miocardiocitos fueron infectados ó pre tratados con 20 ng/ml de IL-10 por 15 min. A las 48 h post infección, se cuantificaron los niveles de transcripción de MMP-9 y MMP-2 mediante Q-RT-PCR. La expresión de los ARNm, en unidades arbitrarias (u.a.), se representa como la cantidad de ARNm relativa al tiempo 0 y normalizada con 18S. Los resultados muestran un experimento representativo de tres realizados y los valores corresponden a la media  $\pm$  SD. \*\* $p < 0,01$  vs. control; ^ $p < 0,01$  vs. *T. cruzi*.

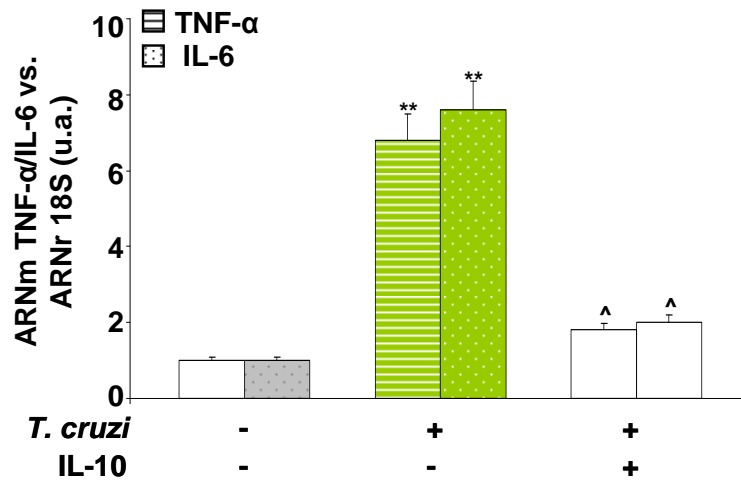
Para evaluar si esta inhibición de la expresión de los ARNm ejercida por IL-10 se correlaciona con una modulación sobre la actividad de estas enzimas, sobrenadantes de miocardiocitos tratados o no con IL-10 e infectados por 72 h fueron sometidos a ensayos de zimografía. Éstos demostraron que IL-10 inhibe de manera significativa la actividad gelatinolítica de las proenzimas de MMP-9 y MMP-2 inducida por la infección con *T. cruzi* en los miocardiocitos (Fig. 24).



**Figura 24. Efecto de IL-10 sobre la actividad de MMP-2 y MMP-9 en miocardiocitos infectados con *T. cruzi*.** La actividad de ambas MMPs fue analizada en ensayos de zimografía a partir de sobrenadantes de miocardiocitos sin infectar, infectados por 72 h o tratados por 15 min con 20ng/ml de IL-10 previo a la infección. Las barras ralladas corresponden a los valores de actividad de MMP-9 y las barras llenas corresponden a la actividad de MMP-2. Los resultados están representados respecto al control en (u.a.) y los resultados son representativos de tres experimentos independientes. \*\* $p < 0,01$  vs. control; \* $p < 0,05$  vs. control; # $p < 0,05$  vs. *T. cruzi*.

### 1.3 IL-10 modula la expresión de TNF- $\alpha$ e IL-6

Dado que desde su descubrimiento IL-10 ha sido principalmente caracterizada como un factor inhibidor de la síntesis de citoquinas proinflamatorias, nos preguntamos si en nuestro modelo de infección de miocardiocitos con *T. cruzi* esta citoquina antiinflamatoria podría modular la expresión de TNF- $\alpha$  e IL-6. Para ello, los miocardiocitos en cultivo fueron infectados o pretratados con IL-10 y evaluamos, mediante Q-RT-PCR, la transcripción de ambas citoquinas. La figura 25 muestra una clara inhibición en los niveles transcripcionales tanto de TNF- $\alpha$  como de IL-6 a las 4 h post infección con *T. cruzi*.



**Figura 25. Inhibición de TNF- $\alpha$  e IL-6 por IL-10.** Los miocardiocitos fueron infectados por 4 h con *T. cruzi* o tratados con 20 ng/ml de IL-10 15 min previo a la infección. Las barras ralladas representan los valores de ARNm de TNF- $\alpha$  y las barras punteadas los valores del ARNm de IL-6 (u.a.), ambos relativos al tiempo 0 y normalizados con 18S. Los resultados muestran un experimento representativo de tres realizados y los valores corresponden a la media  $\pm$  SD. \*\* $p < 0,01$  vs. control; ^ $p < 0,01$  vs. *T. cruzi*.

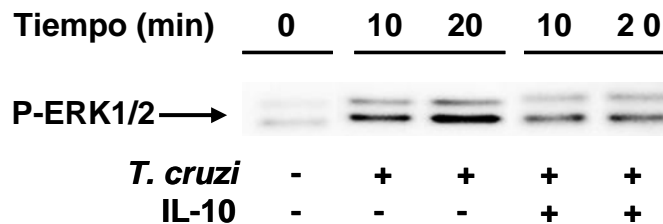
## 2 Vías de señalización involucradas en los efectos antiinflamatorios de IL-10 en células cardíacas infectadas con *T. cruzi*

La activación de las vías de MAPKs y NF- $\kappa$ B conduce a la expresión de mediadores inflamatorios como NO y citoquinas implicadas en respuestas inflamatorias agudas. De hecho, diversos modelos de shock séptico por LPS han demostrado que para el desarrollo de una eficiente respuesta inflamatoria se requiere de una interrelación entre ambas cascadas de señalización (Wu TT. y col. 2011).

En este trabajo nosotros detectamos que la activación de las vías ERK1/2 y NF- $\kappa$ B resulta crítica para inducir la respuesta inflamatoria frente a la infección de miocardiocitos con *T. cruzi*. Además, en los resultados anteriores hemos demostrado que la adición de IL-10 inhibe la expresión y actividad de NOS2 y MMPs así como la inducción de las citoquinas proinflamatorias TNF- $\alpha$  e IL-6. Por lo tanto, el siguiente paso fue evaluar si ERK1/2 y NF- $\kappa$ B están implicadas en los efectos antiinflamatorios ejercidos por IL-10 en nuestro modelo de células cardíacas infectadas con la cepa letal RA de *T. cruzi*.

### 2.1 IL-10 regula la activación de ERK1/2 y de NF-κB

En una primera instancia nos pareció interesante evaluar la activación temprana de ERK1/2 luego de la infección de los miocardiocitos, y su posible modulación por IL-10. Para ello, las células fueron infectadas a tiempos cortos con *T. cruzi* y pretratadas con IL-10. A partir de extractos citosólicos realizamos ensayos de Wb en los cuales pudimos detectar fosforilación temprana de esta vía a los 10 y 20 min post infección, indicando activación. Más aún, comprobamos que IL-10 inhibe la fosforilación de ERK1/2 en los miocardiocitos infectados y tratados con esta citoquina (Fig. 26).

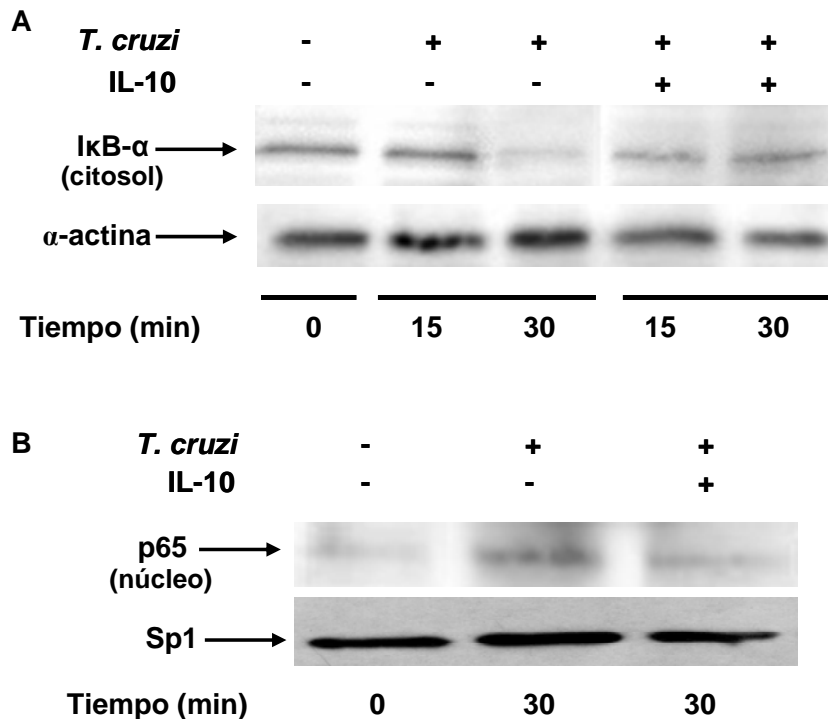


**Figura 26. Activación de ERK1/2 tras la infección con *T. cruzi* y modulación por IL-10.** Los miocardiocitos fueron infectados con *T. cruzi* o pretratados con 20 ng/ml de IL-10 por 15 min y se obtuvieron extractos citosólicos a los 10 y 20 min post infección. La detección de P-ERK1/2 se realizó por Wb mediante la utilización de un anticuerpo específico que reconoce la forma fosforilada de esta proteína. Los resultados son representativos de tres experimentos independientes.

Debido a que previamente se ha descrito que IL-10 es capaz de modular la activación de NF-κB, tanto por aumento de la estabilidad en citoplasma de IκB como por disminución de la activación y pegado al ADN (Mazighi M. y col. 2004, Raychaudhuri B. y col. 2000), en este trabajo decidimos analizar la posible regulación de IL-10 sobre la activación de esta vía en los miocardiocitos infectados con *T. cruzi*.

Mediante ensayos de Wb observamos que la infección con *T. cruzi* induce activación de NF-κB, ya que detectamos menor presencia de la proteína inhibitoria, IκB-α, a los 30 min de infección. En los extractos proteicos de miocardiocitos pretratados con IL-10 esta activación inducida por la infección resulta revertida ya que podemos observar que IκB no desaparece del citoplasma (Fig. 27A). Más aún, también mediante Wb evaluamos la

translocación de la subunidad p65 de NF- $\kappa$ B al núcleo celular a partir de extractos proteicos nucleares, y observamos que IL-10 inhibe la translocación de p65 inducida por la infección de los miocardiocitos con *T. cruzi*, indicando una menor activación de la vía (Fig. 27B).

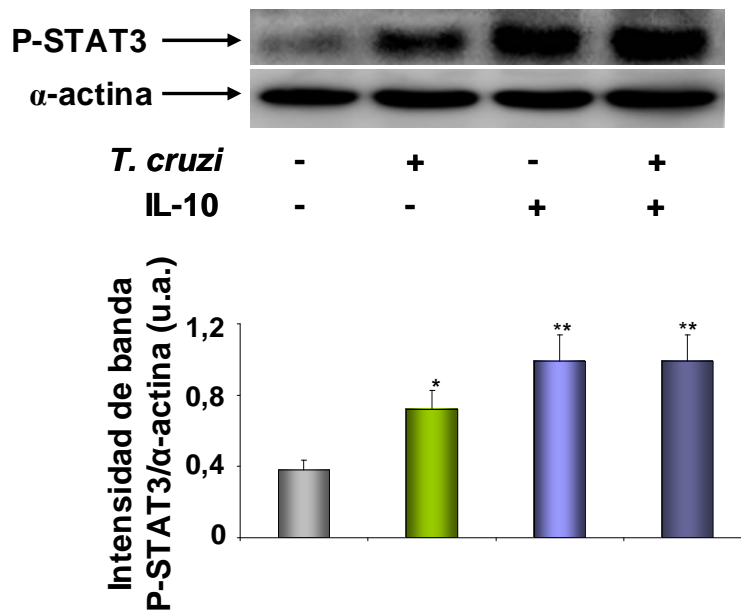


**Figura 27. IL-10 modula la activación de NF- $\kappa$ B en miocardiocitos infectados con *T. cruzi*** Los miocardiocitos fueron infectados o pretratados con 20 ng/ml de IL-10. Al cabo de 15 y 30 min de infección se obtuvieron extractos proteicos tanto citosólicos como nucleares y mediante ensayos de Wb se evaluó la presencia de I $\kappa$ B- $\alpha$  en el citosol (A) o de p65 en el núcleo (B). En A se utilizó  $\alpha$ -actina para normalizar y en B, se normalizó con anticuerpo anti-Sp1. Los resultados son representativos de tres experimentos independientes.

## **2.2 STAT3 y SOCS-3 participan en los efectos antiinflamatorios ejercidos por IL-10**

El reconocimiento de IL-10 por su receptor dispara la activación de la vía de Jak/STAT3, y diversos trabajos sostienen que las acciones antiinflamatorias de IL-10, así como efectos sobre la diferenciación y proliferación de diversas células inmunes, dependen exclusivamente de la activación del factor de transcripción STAT3 (Takeda K. y col. 1999, Williams LM. y col. 2004, Williams LM. y col. 2007).

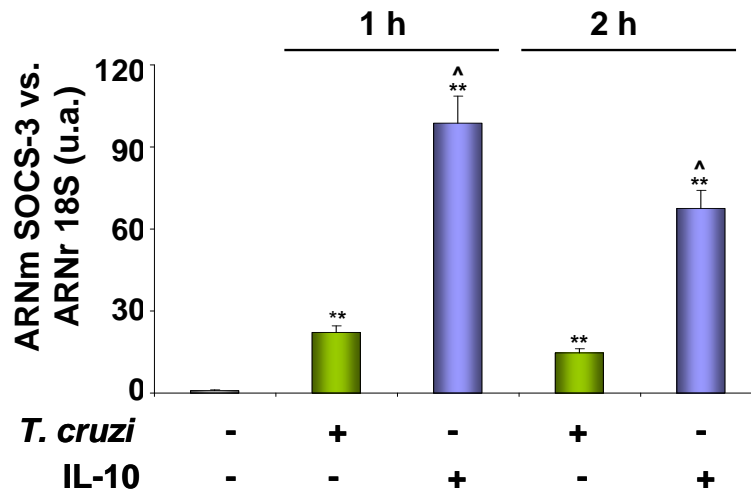
A fin de investigar los mecanismos involucrados en los efectos ejercidos por IL-10 en nuestro modelo de infección, decidimos evaluar en primer lugar la activación de STAT3. Para ello, los miocardiocitos fueron tratados con IL-10, infectados o pretratados e infectados con *T. cruzi*. Al cabo de 30 min se obtuvieron extractos citosólicos y mediante Wb se evaluó la activación de STAT3 utilizando un anticuerpo específico que reconoce la forma fosforilada. La figura 28 muestra que tanto la infección como la adicción exógena IL-10 inducen activación de STAT3, siendo significativamente mayor en respuesta a IL-10. Sin embargo, no se detectan diferencias entre la fosforilación inducida por IL-10 y aquella observada en células infectadas con *T. cruzi* y tratadas con IL-10.



**Figura 28. Activación de STAT3.** Los miocardiocitos en cultivo fueron infectados con *T. cruzi*, tratados con 20 ng/ml de IL-10 o infectados y tratados. Mediante ensayos de Wb se analizó la activación de STAT3 a partir de la utilización de un anticuerpo que reconoce la forma fosforilada de esta proteína. Se utilizó α-actina para normalizar. Los resultados son representativos de tres experimentos independientes y los valores corresponden a la media ± SD. \*p<0,05 vs. control; \*\*p<0,01 vs. control; #p<0,05 vs. *T. cruzi*.

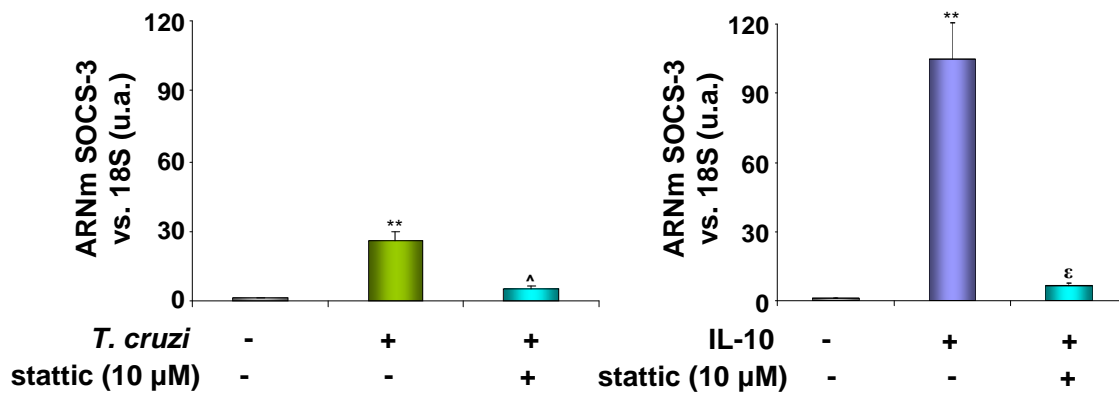
Una característica de la vía de STAT3 es que al activarse, promueve la expresión de genes que codifican para proteínas supresoras de la señalización por citoquinas, como SOCS-3, las cuales están íntimamente relacionadas a la activación de la señalización por IL-10 (He B. y col. 2003). Estas proteínas han sido implicadas en la modulación de respuestas inflamatorias en diferentes modelos (Huang N. y col. 2012, Veenbergen S. y col. 2011). Es por ello que nos pareció importante evaluar en nuestros cultivos primarios de miocardiocitos, si la adición de IL-10 o la infección con *T. cruzi* ejercen modificaciones en la expresión de SOCS-3. Mediante ensayos de Q-RT-PCR pudimos observar que tanto *T. cruzi* como IL-10 inducen la transcripción temprana del ARNm de SOCS-3, siendo significativamente mayor en miocardiocitos tratados con IL-10 (Fig. 29).





**Figura 29. Expresión de SOCS-3 en miocardiocitos frente a la infección con *T. cruzi* o a la adición de IL-10.** Las células en cultivo fueron infectadas o tratadas con 20 ng/ml de IL-10 por 1 y 2 h. Mediante Q-RT-PCR se cuantificaron los niveles de transcripción del ARNm de SOCS-3. La expresión del ARNm, en unidades arbitrarias (u.a.), se representa como la cantidad de ARNm relativa al tiempo 0 y normalizada con 18S. Los resultados son representativos de tres experimentos independientes y los valores corresponden a la media  $\pm$  SD. \*\*p<0,01 vs. control; ^p<0,01 vs. *T. cruzi*.

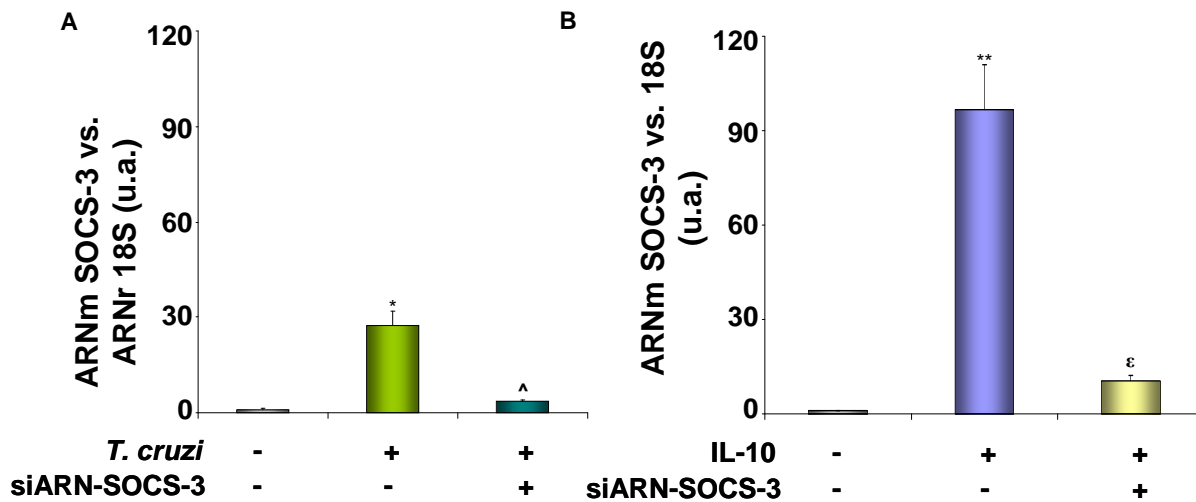
Una vez detectada la expresión de SOCS-3, y a modo de confirmar la participación de STAT3, los miocardiocitos fueron incubados con stattic, un inhibidor específico de la activación de STAT3 e infectados con *T. cruzi* o tratados con IL-10. Evaluamos mediante Q-RT-PCR los niveles del ARNm de SOCS-3 en presencia del inhibidor y corroboramos que su expresión depende de la activación de STAT3 dado que stattic disminuye de manera significativa la expresión de SOCS-3 inducida tanto por la infección como por IL-10 (Fig. 30). Se realizó un control con miocardiocitos tratados solamente con stattic, en el cual no se detectó ninguna diferencia respecto al control y el tratamiento tampoco afectó la viabilidad de los miocardiocitos (determinada por tinción con azul tripán) (datos no mostrados).



**Figura 30. La expresión de SOCS-3 depende de la activación de STAT3.** Los miocardiocitos fueron tratados con statin, un inhibidor de la activación de STAT3 (10 μM) por 30 min e infectados con *T. cruzi* o tratadas con 20 ng/ml de IL-10 por 1 h. Mediante Q-RT-PCR se cuantificaron los niveles de transcripción de SOCS-3. La expresión, en unidades arbitrarias (u.a.), se representa como la cantidad de ARNm relativa al tiempo 0 y normalizada con 18S. Los resultados son representativos de tres experimentos independientes y los valores corresponden a la media ± SD. \*\*p<0,01 vs. control; ^p<0,01 vs. *T. cruzi*; εp<0,01 vs. IL-10.

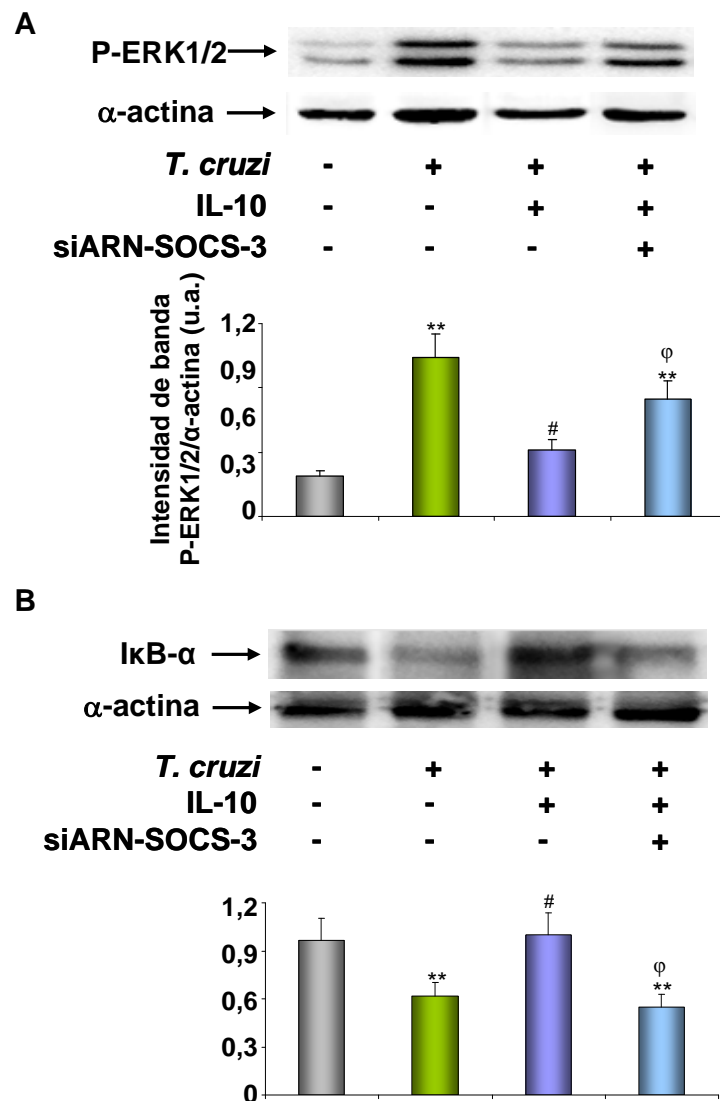
### 2.3 SOCS-3 está involucrado en los efectos antiinflamatorios ejercidos por IL-10

Con el objetivo de investigar con mayor profundidad si los efectos ejercidos por IL-10 involucran la expresión de SOCS-3, decidimos silenciar su expresión mediante la técnica de ARN de interferencia (siARN-SOCS-3) y evaluar, en estas condiciones, la capacidad de IL-10 de ejercer sus acciones antiinflamatorias en los miocardiocitos infectados con *T. cruzi*. En primer lugar realizamos ensayos de Q-RT-PCR con el objeto de evaluar la eficacia del silenciamiento. En las figuras 31A y 31B observamos que en los miocardiocitos transfectados con siARN-SOCS-3, la expresión de SOCS-3 resulta impedida tanto frente a la infección con *T. cruzi* como tras la adición de IL-10.



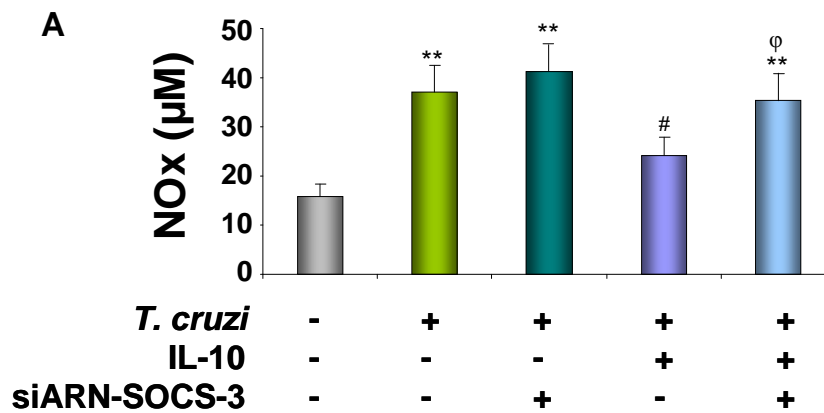
**Figura 31. Silenciamiento de SOCS-3 en miocardiocitos infectados con *T. cruzi* o incubados con IL-10.** Mediante Q-RT-PCR se cuantificaron los niveles de expresión de SOCS-3 en miocardiocitos transfectados con siARN-SOCS-3 e infectados con *T. cruzi* por 1 h (A) o tratados con 20 ng/ml de IL-10 por 1 h (B). La expresión del ARNm, en unidades arbitrarias (u.a.), se representa como la cantidad de ARNm de SOCS-3 relativa a los respectivos controles y normalizada con 18S. Los resultados representan tres experimentos independientes, y los valores corresponden a la media  $\pm$  SD. \*\*p<0,01 vs. control; ^p<0.01 vs. *T. cruzi*; εp<0,01 vs. IL-10.

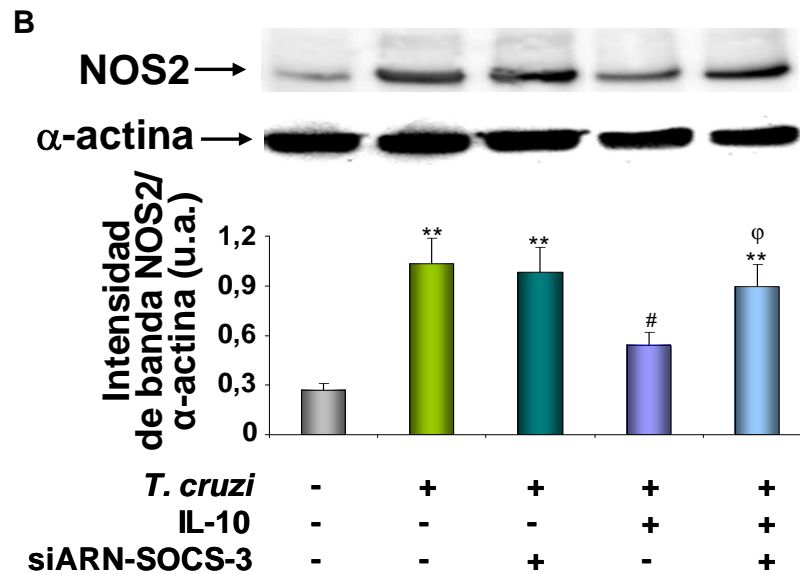
Una vez corroborada la eficiencia del silenciamiento, decidimos investigar si los efectos ejercidos por IL-10 son mediados a través de SOCS-3. En primer lugar evaluamos la posible participación de SOCS-3 en la inhibición de la activación de las vías de señalización de ERK1/2 y de NF-κB observada tras la adición de IL-10 a los miocardiocitos infectados. Para ello, las células fueron transfectadas con siARN-SOCS-3 y mediante ensayos de Wb observamos que el silenciamiento de SOCS-3 impide el efecto inhibitorio de IL-10 sobre la fosforilación de ERK1/2 (Fig. 32A). También, mediante Wb detectamos que al silenciar SOCS-3, IL-10 no consigue inhibir la activación de NF-κB. La figura 32B muestra que en las células transfectadas con siARN-SOCS-3 y tratadas con IL-10, los niveles de IκB-α son semejantes a los observados tras la infección, indicando que la expresión de SOCS-3 es necesaria para que IL-10 inhiba NF-κB.



**Figura 32. Participación de SOCS-3 en los efectos inhibitorios de IL-10 sobre la activación de ERK1/2 y NF-κB.** Los miocardiocitos fueron infectados con *T. cruzi* y pretratados con 20 ng/ml de IL-10 por 15 min o transfectados con siARN-SOCS-3, tratados con IL-10 e infectados con *T. cruzi*. (A) Se obtuvieron extractos citosólicos al cabo de 20 min de infección y mediante Wb se detectó la activación de ERK1/2 a partir de la utilización de un anticuerpo específico que reconoce la forma fosforilada de esta proteína. (B) Se obtuvieron extractos citosólicos al cabo de 30 min de infección y mediante Wb se detectó la expresión de IκB-α. Se utilizó un anticuerpo contra α-actina para normalizar y los resultados representan la media ± SD de tres experimentos independientes. \*\*p<0,01 vs. control; #p<0,05 vs. *T. cruzi*, <sup>φ</sup>p<0,05 vs. *T. cruzi* + IL-10.

A partir de los resultados obtenidos anteriormente, nos preguntamos si el silenciamiento de SOCS-3 también revierte los efectos moduladores de IL-10 sobre la respuesta inflamatoria inducida por la infección. Para ello, las células fueron tratadas con IL-10 e infectadas o transfectadas con siARN-SOCS-3 y se evaluó la producción de NO y la expresión de NOS2 como medida de la respuesta inflamatoria generada. La figura 33A muestra que en los miocardiocitos donde SOCS-3 fue silenciado, IL-10 no pudo ejercer su efecto modulador sobre la producción de NO. Asimismo, al evaluar la expresión de NOS2 mediante ensayos de Wb observamos que el silenciamiento de SOCS-3 impide el efecto inhibitorio ejercido por IL-10 frente a la infección con *T. cruzi* (Fig. 33B). Estos resultados confirman que la vía STAT3/SOCS-3 participa en los efectos moduladores de IL-10 sobre la infección con *T. cruzi*.





**Figura 33. SOCS-3 participa en la inhibición de NOS2 ejercida por IL-10 en miocardiocitos infectados con *T. cruzi*.** (A) Las células cardíacas fueron infectadas, pretratadas con IL-10 (20 ng/ml) o transfectadas con siARN-SOCS-3 previo a la infección. Al cabo de 48 h se cuantificaron los niveles de (nitritos/nitratos) NOx ( $\mu$ M) acumulados en los sobrenadantes mediante ensayos de Griess (B) Se evaluó la expresión de NOS2 por Wb en las mismas condiciones que en A utilizando anticuerpo contra  $\alpha$ -actina para normalizar. Para A, los resultados representan la media  $\pm$  SD de cuatro experimentos independientes. En B, los resultados son representativos de tres experimentos independientes. Los valores corresponden a la media  $\pm$  SD.  $**p < 0,01$  vs. control;  $\#p < 0,05$  vs. *T. cruzi*,  $\phi p < 0,05$  vs. *T. cruzi* + IL-10.

La fase aguda de la enfermedad de Chagas se caracteriza por la presencia de un alto número de tripomastigotes de *T. cruzi* en circulación, parasitismo en diversos tipos celulares, principalmente en tejido muscular, e inflamación generalizada. El proceso inflamatorio iniciado en esta etapa puede provocar daños en el miocardio y en el sistema de conducción que a largo plazo promueven anomalías microvasculares coronarias y alteraciones cardíacas observables en la fase crónica de la miocardiopatía (Marin-Neto JA. y col. 2007). Los modelos experimentales de infección *in vivo* e *in vitro* con diferentes cepas de *T. cruzi* o sus antígenos han sido de gran utilidad para la determinación del rol de mediadores inflamatorios en la fase aguda de la infección. A pesar de que *T. cruzi* puede infectar a cualquier tipo celular, el tejido cardíaco es uno de los blancos principales siendo la miocardiopatía la manifestación más común y grave en las infecciones por este parásito. En este sentido, existen evidencias que demuestran que los miocardiocitos participan activamente en la respuesta cardíaca frente a la infección por *T. cruzi* (Aoki MP. y col. 2006, Machado FS. y col. 2000, Machado FS. y col. 2008, Postan M. y col. 1999). Recientemente, un estudio realizado por Manque PA. y col. (2011) reveló que los miocardiocitos expresan numerosos genes relacionados con inflamación, reorganización del citoesqueleto, interacciones célula-célula, apoptosis, ciclo celular y estrés oxidativo durante la invasión y en etapas tempranas de la infección con *T. cruzi*.

Los resultados obtenidos en la primera parte de este trabajo, en el que cultivos primarios de miocardiocitos fueron infectados con la cepa RA de *T. cruzi*, indican que los miocardiocitos son capaces de responder a la infección mediante la expresión de diversos mediadores inflamatorios. En primer lugar, mediante análisis inmunocitoquímicos confirmamos que los tripomastigotes infectan a los miocardiocitos en cultivo, donde se diferencian amastigotes. En respuesta a la infección las células cardíacas expresaron NOS2, una enzima inducible típicamente implicada en procesos inflamatorios. La activación de esta enzima fue revelada mediante la cuantificación del producto de su activación, NO, en los sobrenadantes de las células infectadas. También detectamos síntesis temprana de las citoquinas proinflamatorias IL-6 y TNF- $\alpha$  en nuestro modelo de infección aguda con *T. cruzi*. En este sentido, Silva JS. y col. (1995) fueron unos de los primeros en describir que la síntesis de NO por macrófagos infectados con *T. cruzi* depende, en parte, de la producción de TNF- $\alpha$  y remarca que estos mediadores

proinflamatorios son potentes inductores de la inflamación tisular, y actúan en detrimento del hospedador. Asimismo, Fichera L. y col (2004) demostraron la capacidad de células cardíacas de rata infectadas con *T. cruzi* para producir NO luego de ser estimuladas por diversas citoquinas. Por otro lado, en un trabajo reciente también se ha reportado que cultivos primarios de miocardiocitos liberan IL-6 como parte de la respuesta a la infección con *T. cruzi*, y que esta citoquina jugaría un papel protector ya que inhibe la apoptosis celular (Ponce NE. y col. 2012).

Los resultados obtenidos respecto a la activación de las cascadas de señalización de ERK1/2 y NF- $\kappa$ B en nuestro modelo de miocardiocitos infectados con *T. cruzi* concuerdan con lo observado en otros modelos experimentales. Por ejemplo, se ha descrito un estado de fosforilación temprano de la MAPK ERK1/2 tras el estímulo de células dendríticas con tripomastigotes y LPS (Poncini CV. y col. 2010). Otros autores, en un modelo *in vivo* de infección con *T. cruzi* reportaron que tanto la fosforilación de ERK1/2, y su contribución a la activación de AP-1 así como la activación de la vía de NF- $\kappa$ B, serían responsables de la remodelación cardíaca en la miocardiopatía chagásica (Huang H. y col. 2003). Asimismo, la importancia del papel de NF- $\kappa$ B como un integrador de la respuesta inflamatoria del hospedador ha sido analizado en un modelo de infección de células epiteliales con *T. cruzi*, donde observaron que la activación de NF- $\kappa$ B inducida por TNF- $\alpha$  favorece la invasión parasitaria (Pinto AM. y col. 2011).

En este trabajo, también examinamos la capacidad de las células cardíacas de inducir la expresión de metaloproteasas (MMPs) en respuesta a la infección debido a que son una familia de proteasas que participan activamente en la remodelación de la MEC. Ha sido descrito que la actividad aumentada de estas enzimas puede alterar el equilibrio entre la síntesis y degradación de colágeno, asociado al daño tisular durante el comienzo del proceso inflamatorio y en diferentes patologías cardiovasculares incluyendo arteriosclerosis y fallo cardíaco (Phatharajaree W. y col. 2007, Vanhoutte D. y Heymans S. 2010). Publicaciones anteriores de nuestro grupo han reportado que los miocardiocitos son capaces de expresar y activar MMP-9 en respuesta al estímulo de LPS en diferentes modelos experimentales (Cuenca J. y col. 2006, Hovsepian E. y col. 2010). En este trabajo demostramos que la infección de cultivos de miocardiocitos con *T. cruzi* induce expresión y actividad de MMP-9 y MMP-2. Esto también fue descrito en una publicación reciente de nuestro grupo en la cual detectamos expresión de MMP-9 y MMP-2 en tejido



cardíaco y actividad de las mismas en suero de ratones infectados con la cepa letal RA y con la no letal, K98, de *T. cruzi* (Penas F. y col. 2012). Asimismo, Geurts N. y col. (2012) postulan que las MMPs contribuyen de manera importante a la progresión de la enfermedad de Chagas y otras infecciones parasitarias ya que son responsables del remodelamiento de la MEC del miocardio y de la generación de fibrosis en el corazón, contribuyendo así al desarrollo de la miocardiopatía chagásica.

Por un lado, la generación de una intensa respuesta inflamatoria en la etapa aguda de la enfermedad de Chagas es importante para el control inicial de la infección por *T. cruzi*, pero por otro lado puede ser perjudicial si persiste durante períodos prolongados. Por ello, Higuchi M de L. y col (2003) sostienen que una respuesta inflamatoria prolongada, especialmente en el corazón, puede progresar a fibrosis generando miocardiopatía dilatada y disfunción del miocardio que a largo plazo provocan morbilidad y/o mortalidad. Por lo tanto, nos planteamos la necesidad de encontrar nuevas estrategias coadyuvantes a los parasiticidas clásicos para el tratamiento de esta enfermedad debilitante crónica. En este sentido, nuestro trabajo consistió en evaluar la capacidad de la prostaglandina 15-deoxi- $\Delta^{12,14}$ -PGJ2 (15dPGJ2), ligando natural de PPAR $\gamma$ , y de la citoquina IL-10 de modular la respuesta inflamatoria en cultivos primarios de miocardiocitos infectados con la cepa letal RA de *T. cruzi*.

El abordaje del estudio del papel que desempeñan los ligandos de PPAR $\gamma$  en infecciones por *T. cruzi* o en la enfermedad de Chagas no ha sido suficientemente investigado hasta el momento. Sin embargo, ha sido ampliamente descrito que los ligandos de PPAR $\gamma$  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, Su CG. y Lewis JD. 2001, Wada K. y col. 2001), Alzheimer (Combs CK. y col. 2000, Heneka MT. y col. 2000, Landreth GE. y Heneka MT. 2001) y lupus nefritis (Reilly CM. y col. 2000, Reilly CM. y col. 2001). Más aún se ha descrito que el ligando natural de PPAR $\gamma$ , 15dPGJ2, protege frente a falla multiorgánica asociada a endotoxemia (Collin M. y col. 2004). En un trabajo publicado por Hickson-Bick y col. se ha reportado que cultivos primarios de miocardiocitos ventriculares de rata expresan 15dPGJ2 en el rango nM frente al estímulo con LPS. Sin embargo, los efectos antiinflamatorios ejercidos por esta prostaglandina sólo pueden ser detectados cuando se adiciona de manera

exógena, en el rango  $\mu\text{M}$  (Hickson-Bick DLM. y col. 2006). Asimismo, nosotros hemos demostrado que 15dPGJ2 ejerce efectos antiinflamatorios sobre miocardiocitos aislados de ratones neonatos en un modelo experimental de shock séptico por LPS (Hovsepian E. y col. 2010).

En este trabajo pudimos determinar que el ligando de PPAR $\gamma$  inhibió la expresión y actividad de NOS2 inducidas por la infección con *T. cruzi*. Esta modulación parece ser mediada a nivel transcripcional ya que 15dPGJ2 reguló la expresión de NOS2 a nivel de su ARNm. Además, 15dPGJ2 moduló la expresión de los ARNm de las citoquinas proinflamatorias TNF- $\alpha$  e IL-6 inducidas por la infección. Asimismo, en los miocardiocitos infectados y tratados con el agonista de PPAR $\gamma$ , detectamos un mayor parasitismo en comparación con el observado en las células infectadas pero no tratadas. En un trabajo reciente de nuestro grupo pudimos corroborar estos mismos efectos de PPAR $\gamma$  en un modelo *in vivo*, en el cual el tratamiento con 15dPGJ2 de ratones infectados con las cepas RA y K98 de *T. cruzi* inhibió tanto la expresión cardíaca de NOS2 como de citoquinas proinflamatorias. En ese mismo estudio hemos detectado una mayor parasitemia y un mayor parasitismo cardíaco en los ratones infectados y tratados con 15dPGJ2 respecto a aquellos infectados pero no tratados. Sin embargo, no hemos encontrado diferencias en las tasas de mortalidad entre ambos grupos de ratones (Penas F. y col. 2012). Estos hallazgos sugieren que tanto el NO como las citoquinas TNF- $\alpha$  e IL-6 estarían participando en la regulación del parasitismo. En este sentido, se ha reportado en ratones *knock out* para NOS2 infectados con *T. cruzi*, una elevada expresión de citoquinas proinflamatorias tales como IFN $\gamma$ , TNF- $\alpha$  e IL-1, a las que se les atribuye un papel tanto en el control de la multiplicación del parásito como en la sobrevivencia de dichos ratones (Cummings KL. y Tarleton RL. 2004). Sin embargo, el papel que desempeñan estos mediadores inflamatorios en las infecciones por *T. cruzi* parece ser dual ya que se ha demostrado que pueden ejercer efectos tanto protectivos como tóxicos. Por un lado, numerosos autores han demostrado que la presencia de estos mediadores es requisito para eliminar los parásitos intracelulares y prevenir la diseminación a circulación (Fichera LE. y col. 2004, Gao W. y Pereira MA. 2002, Hölscher C. y col. 1998, Machado FS. y col. 2000, Machado FS. y col. 2008, Rodrigues MM. y col. 2000, Silva JS. y col. 1995, Venturini G. y col. 2000). Por otro lado, se ha descrito tanto en modelos animales como

en pacientes chagásicos que un exceso en la producción de NO y TNF- $\alpha$  provoca daños en el miocardio contribuyendo a la disfunción cardíaca (Chandrasekar B. y col. 1998, Durand JL. y col. 2009, Huang H. y col. 1999). Asimismo, la expresión aumentada de NOS2, de citoquinas y quimioquinas proinflamatorias podría contribuir al daño inflamatorio observado en el músculo esquelético tras la infección de ratones con la cepa RA de *T. cruzi* (Cutrullis RA. y col. 2009).

En este trabajo también evaluamos los efectos de 15dPGJ2 sobre la expresión y actividad de MMP-9 y MMP-2 en los miocardiocitos infectados con *T. cruzi*. Los resultados obtenidos demuestran que el ligando de PPAR $\gamma$  inhibe de manera significativa la expresión de ambas MMPs tanto a nivel transcripcional como así también su actividad en las células infectadas. Este resultado fue corroborado en el modelo de infección que nuestro grupo ha desarrollado *in vivo*, en el cual detectamos que 15dPJJ2 disminuye la expresión cardíaca de ambas MMPs y su actividad en el suero de ratones infectados (Penas F. y col. 2012). En este sentido, Gutierrez FR. y col (2008) sostienen que las MMPs son enzimas que al activarse contribuyen a la miocardiopatía chagásica ya que la sobre expresión de éstas se relaciona directamente con la mortalidad de ratones en un modelo de infección aguda con *T. cruzi*. Asimismo, se ha descrito recientemente que tanto MMP-9 como MMP-2 son responsables de los cambios observados en la MEC de las vellosidades coriónicas de la placenta durante la infección por *T. cruzi* y que ambas participan activamente en la invasión de los tejidos (Castillo C. y col .2012). Por otro lado, ha sido reportado que placentas de ratas diabéticas presentan altos niveles de actividad de MMP-9 y MMP-2, y que 15dPGJ2 modula el balance entre las MMPs y los TIMP favoreciendo una correcta función de la placenta y de los órganos fetales (Pustovrh MC. y col. 2009).

En los últimos años, el papel de los receptores PPAR ha atraído la atención de distintos grupos de investigadores respecto a su rol en enfermedades parasitarias y se han reportado trabajos con resultados contradictorios respecto a como varía su expresión. Por ejemplo, en un modelo murino de leishmaniasis se sugiere que la expresión de PPAR se modifica de modo selectivo según el tejido o la isoforma de PPAR, ya que PPAR $\gamma$  aumenta en el hígado y en el bazo mientras que la expresión de PPAR $\alpha$  solo se ve aumentada en hígado (Adapala N. y Chan MM. 2008). También se ha descrito que la infección con *Schistosoma japonicum* disminuye los niveles hepáticos del ARNm de

PPAR $\gamma$  en un modelo murino de schistosomiasis (Chen H. y col. 2008). Por lo tanto, decidimos evaluar en una primera instancia el papel de este receptor en los efectos ejercidos por su ligando 15dPGJ2. En primer lugar analizamos la expresión de PPAR $\gamma$  en nuestro modelo de infección aguda y detectamos mediante ensayos de Q-RT-PCR que *T. cruzi* es capaz de aumentar significativamente la expresión de su ARNm. Este resultado concuerda con resultados obtenidos en otros trabajos de nuestro grupo en los que se ha detectado aumento en la expresión de PPAR $\gamma$  y de PPAR $\alpha$  en macrófagos peritoneales de ratones infectados con las cepas RA y K98 de *T. cruzi* (Tesina Vera M. 2012). Además, en el modelo *in vivo* de infección con *T. cruzi* también determinamos un aumento en la expresión cardíaca de PPAR $\gamma$  tras la infección con ambas cepas (Penas F. y col. 2012). Este fenómeno podría indicarnos que los tejidos afectados se preparan para una respuesta que resuelva la inflamación.

A pesar de que los efectos antiinflamatorios de 15dPGJ2 han atraído un interés de investigación considerable, sus mecanismos esenciales siguen siendo objeto de estudio ya que éstos pueden ser dependientes o independientes de su receptor. Con el objeto de abordar el estudio sobre la participación de PPAR $\gamma$  en los efectos ejercidos por 15dPGJ2 en nuestro modelo de infección de miocardiocitos, utilizamos en primer lugar un antagonista específico e irreversible de PPAR $\gamma$ , GW9662. Los resultados nos indican que, en presencia del antagonista, los efectos inhibitorios de 15dPGJ2 sobre la producción de NO fueron revertidos. Para profundizar el estudio acerca de los mecanismos que utiliza 15dPGJ2 para ejercer sus efectos inhibitorios sobre parámetros inflamatorios, decidimos evaluar la vía dependiente de su receptor silenciando la expresión de PPAR $\gamma$  mediante la técnica de ARN de interferencia (siARN-PPAR $\gamma$ ). Los resultados obtenidos demuestran claramente que PPAR $\gamma$  participa en los efectos inhibitorios ejercidos por 15dPGJ2 sobre la expresión y actividad de NOS2, MMP-9 y MMP-2, indicando que estos receptores nucleares son factores que contribuyen a la modulación de la respuesta inflamatoria cardíaca. Además, pudimos comprobar que el aumento en el parasitismo inducido por 15dPGJ2 también es un efecto mediado a través de PPAR $\gamma$ . Este resultado concuerda con un estudio previo donde se reportó que tanto ligandos de PPAR $\gamma$  como de PPAR $\delta$  promueven el crecimiento intracelular de amastigotes en macrófagos infectados con *Leishmania major* (Gallardo-Soler A. y col. 2008).

Existen evidencias que indican que los efectos antiinflamatorios de 15dPGJ2 también son ejercidos a través de la inhibición de la transcripción de genes de manera independiente de su receptor, a través de la vía de NF- $\kappa$ B (Castrillo A. y col. 2000, Rossi A. y col. 2000, Straus DS. y col. 2000) y de las MAPK (Lee JH. y col. 2008) en diversos modelos experimentales. En este sentido, en un trabajo previo de nuestro grupo demostramos que 15dPGJ2 también puede actuar a través de mecanismos independientes a PPAR $\gamma$  involucrando a las vías de señalización de NF- $\kappa$ B y MAPK en un modelo de miocardiocitos estimulados con LPS (Hovsepian E. y col. 2010).

En este trabajo demostramos por primera vez que 15dPGJ2 regula la respuesta inflamatoria de miocardiocitos infectados con *T. cruzi* mediante mecanismos dependientes e independientes de PPAR $\gamma$ . 15dPGJ2 inhibió la activación de la MAPK ERK1/2 y de NF- $\kappa$ B en los miocardiocitos infectados. Además, mediante el silenciamiento de PPAR $\gamma$  junto con la inhibición farmacológica de la activación de ERK1/2 con PD98059, pudimos demostrar que ambos ERK1/2 y PPAR $\gamma$  participan en los efectos ejercidos por 15dPGJ2. Más aún, pudimos observar que en los miocardiocitos tratados con PD98059 y transfectados con siARN-PPAR $\gamma$ , 15dPGJ2 inhibió de forma parcial la expresión y actividad de NOS2, sugiriendo la participación de otra vía diferente de estas dos estudiadas. Por ello, al tratar los miocardiocitos infectados con un inhibidor del proteosoma, que impide la activación de NF- $\kappa$ B (MG132), y con el antagonista específico de PPAR $\gamma$ , GW9662, determinamos que 15dPGJ2 no pudo inhibir la expresión ni la actividad de NOS2 bajo estas condiciones. Estos experimentos, junto a la inhibición de la activación de I $\kappa$ B por 15dPGJ2, demuestran la participación de PPAR $\gamma$  y NF- $\kappa$ B en las acciones de 15dPGJ2. Esto fue corroborado en nuestro modelo *in vivo* de infección con cepas de distinta letalidad de *T. cruzi* (Penas F. y col. 2012).

El papel de las citoquinas antiinflamatorias como moduladoras endógenas del proceso inflamatorio presente en la enfermedad de Chagas ha sido evaluado tanto en modelos animales de infección con *T. cruzi* como en pacientes. A principios de los años `90 se describió que la producción de TGF- $\beta$  e IL-10 tanto *in vitro* como *in vivo* es clave para inhibir los niveles elevados de IFN- $\gamma$  y sus efectos perjudiciales inducidos en respuesta a la infección con *T. cruzi* (Silva JS. y col. 1991, Silva JS. y col. 1992). La producción de IL-4 también es importante en la modulación de la respuesta inflamatoria

generada frente a la infección con *T. cruzi* ya que se ha demostrado que ratones *knock out* para IL-4 presentan una mayor respuesta Th1, intensa miocarditis y fibrosis cardíaca extensiva (Soares MB. y col. 2001). Asimismo, IL-10 ejerce un papel protector muy importante en las infecciones con *T. cruzi*. Se ha descrito que ratones *knock out* para esta citoquina son más susceptibles a la infección y presentan altas tasas de mortalidad en comparación con ratones salvajes (Hunter CA. y col. 1997, Roffê E. y col. 2012). Por otro lado, ha sido reportado que una deficiencia en los mecanismos reguladores de la inflamación en pacientes chagásicos, ya sea por falta de IL-10 o por producción excesiva de IFN- $\gamma$  podría contribuir a la patogénesis de la enfermedad (Dutra WO. y col 2005). En este sentido, se ha descrito que células mononucleares de sangre periférica aisladas de pacientes que cursan la fase indeterminada de la enfermedad de Chagas producen mayores niveles de IL-10 en comparación con las aisladas de pacientes que presentan miocardiopatía (Gomes JA. y col. 2003, Souza PE. y col. 2004). En relación con estos hallazgos, se ha reportado que la presencia de células T reguladoras productoras de IL-10 podría ser beneficiosa para limitar la actividad citotóxica y el daño tisular generados por la infección con *T. cruzi* y evitar la aparición de las diferentes formas clínicas de la enfermedad de Chagas (de Araújo FF. y col. 2011, de Araújo FF. y col. 2012). Además, se describió que ciertos pacientes que presentan síntomas cardíacos severos expresan menores niveles de IL-10 y esto se asocia a la presencia de un polimorfismo en la región promotora del gen de IL-10 lo que les confiere susceptibilidad genética al desarrollo de la miocardiopatía (Costa GC. y col. 2009).

A partir de estos antecedentes, decidimos investigar el papel de esta citoquina en nuestro modelo de infección aguda de miocardiocitos con la cepa letal RA de *T. cruzi*. En primer lugar evaluamos la síntesis endógena de esta citoquina en nuestros cultivos primarios de miocardiocitos infectados, pero no pudimos detectar su expresión en ensayos de RT-PCR a tiempo real ni su liberación a los sobrenadantes mediante la utilización de un *kit* de ELISA comercial. Este resultado concuerda con un trabajo reciente de Ponce NE. y col. (2012) en el cual se describió que miocardiocitos aislados e infectados con *T. cruzi* no producen niveles significativos de IL-10. Sin embargo, en modelos *in vivo* de infección con *T. cruzi* se ha descrito expresión cardíaca de IL-10 asociada al infiltrado inflamatorio presente en el corazón (Borges DC. y col. 2012, Trocoli Torrecilhas AC. y col. 2009). El conjunto de estos antecedentes nos sugirió la posibilidad

de evaluar los efectos de la adición exógena de IL-10 en nuestro modelo. Los resultados obtenidos en miocardiocitos infectados y pretratados con IL-10 mostraron que IL-10 inhibe la expresión de NOS2 y su actividad tanto *in vitro*, mediante ensayos de Griess, como *in situ* mediante la utilización de 4-amino-5-metilamino-2',7'-difluorofluoresceína (DAF-FM) un indicador de la producción de NO a tiempo real. Es interesante destacar que en nuestro modelo *in vivo* hemos detectado niveles aumentados de IL-10 en suero de ratones infectados con las cepas RA de *T. cruzi* (Penas F. y col. 2012).

Dado que desde su descubrimiento IL-10 ha sido principalmente caracterizada como un factor inhibidor de la síntesis de citoquinas proinflamatorias, evaluamos su capacidad para modular la expresión de ciertas citoquinas en nuestro modelo de infección de miocardiocitos con *T. cruzi*. Como era de esperarse, observamos que IL-10 inhibe de manera significativa la expresión de TNF- $\alpha$  e IL-6 inducidas por la infección.

Como parte del proceso inflamatorio desencadenado en respuesta a la infección por *T. cruzi*, la expresión y actividad aumentada de MMPs en el corazón puede contribuir al desarrollo de fibrosis, favoreciendo el deterioro de la funcionalidad cardíaca. En este sentido, el papel desempeñado por IL-10 aún no ha sido del todo explorado. Por lo tanto, evaluamos el efecto del tratamiento con esta citoquina en nuestro modelo y detectamos que también es capaz de modular la expresión y actividad de MMP-9 y MMP-2 inducidas por la infección. Este resultado aporta más evidencias acerca del papel de IL-10 como reguladora de la expresión cardíaca de mediadores inflamatorios en infecciones con *T. cruzi* que impediría la progresión de la miocardiopatía chagásica.

Ha sido descrito que el efecto modulador de IL-10 en la respuesta inflamatoria está asociado a la inhibición de NF- $\kappa$ B, ya que disminuye la degradación de la proteína inhibitoria I $\kappa$ B- $\alpha$  impidiendo la translocación nuclear de la subunidad p65 de NF- $\kappa$ B (Raychaudhuri B. y col. 2000, Shames BD. y col. 1998, Wang P. y col. 1995). Nosotros comprobamos el efecto inhibitorio de IL-10 sobre la activación de esta vía en nuestro modelo. Mediante ensayos de Wb detectamos una menor degradación de I $\kappa$ B- $\alpha$  en el citosol y una menor translocación de p65 al núcleo de los miocardiocitos infectados y tratados con IL-10, comparado con los no tratados. Otra vía de señalización que induce la expresión de genes inflamatorios, y que detectamos activada en los miocardiocitos infectados con *T. cruzi*, es la de ERK1/2-MAPK. El pretratamiento con IL-10 de los

miocardiocitos infectados también disminuyó los niveles de fosforilación de ERK1/2, indicando una inhibición de la activación de esta vía.

Entre los mecanismos de señalización activados por IL-10, la fosforilación de STAT3 contribuye en la respuesta antiinflamatoria. Por ejemplo, se ha descrito en un modelo murino de infarto de miocardio que el tratamiento con IL-10 inhibe parámetros inflamatorios e interviene en el proceso de remodelamiento cardíaco vía activación de STAT3 (Krishnamurthy P. y col. 2009). Además, una vez fosforilado, STAT3 forma dímeros que ingresan al núcleo e inducen la transcripción génica de SOCS-3 (He B. y col. 2003). Se ha propuesto que esta proteína participa en el mecanismo por el cual IL-10 modula la respuesta inflamatoria en diversos modelos. Por ejemplo, SOCS-3 ha sido reportado como un mediador clave en los efectos inhibitorios de IL-10 en macrófagos estimulados con LPS (Berlato C. y col. 2002, Huang N. y col. 2012, Qasimi P. y col. 2006) y en un modelo *in vivo* de artritis inducida por colágeno (Veenbergen S. y col. 2011). Además, varios estudios han indicado un papel directo de SOCS-3 en la regulación negativa de la vía de señalización de IFN- $\gamma$  (Gao H. y Ward PA. 2007, Jo D. y col. 2005).

En este trabajo evaluamos la activación de STAT3 y la expresión de SOCS-3 frente a la infección de los miocardiocitos y frente a la adición de IL-10. Los resultados obtenidos demuestran que tanto *T. cruzi* como IL-10 promueven la fosforilación de STAT3 y la expresión de SOCS-3 siendo mayor en los miocardiocitos tratados con IL-10. La utilización de stattic, un inhibidor de la activación de STAT3 que impide su fosforilación y translocación al núcleo, confirmó en nuestro modelo que SOCS-3 es inducido a través de la vía IL-10/STAT3.

Recientemente se ha reportado que SOCS-3 es un inhibidor endógeno de la angiogénesis patológica en modelos murinos de retinopatía proliferativa y cáncer (Stahl A. y col. 2012). Otros autores describieron en una línea celular derivada de pituitaria que la infección con *T. cruzi* induce fosforilación de STAT3, síntesis de IL-6 y expresión de SOCS-3, lo que podría explicar un bloqueo parcial en la producción de ACTH (Corrêa-de-Santana E. y col. 2006). Además, en macrófagos infectados con *Mycobacterium tuberculosis* se determinó inhibición de la activación de NF- $\kappa$ B e inducción en la expresión de SOCS-3 como mecanismos bacterianos de evasión de la respuesta inflamatoria (Nair S. y col. 2012). Por otro lado, SOCS-2 también ha sido reconocido como un modulador de



la respuesta inflamatoria ya que regula la producción de los mediadores inflamatorios TNF- $\alpha$  e IL-12 y favorece la diferenciación del perfil Th2 (Knosp CA. y col. 2011, Machado FS. y col. 2006, Rico-Bautista E. y col. 2006). Más aún, SOCS-2 ha sido implicado en la regulación de la inflamación en modelos de infección con *Toxoplasma gondii* (Machado FS. y Aliberti J. 2006, Machado FS. y col. 2006). La participación de SOCS-2 en infecciones con *T. cruzi* solo ha sido reportada recientemente en un trabajo de Esper L. y col. (2012), donde develan en ratones *knock out* para SOCS-2, que esta proteína es un regulador importante de la respuesta inmune generada frente a la infección aguda con *T. cruzi*. Sin embargo, la relevancia de la expresión de SOCS-3 en los efectos antiinflamatorios ejercidos por IL-10 en infecciones con *T. cruzi* aún no ha sido explorada. Por ello, nos propusimos silenciar la expresión de SOCS-3 mediante ARN de interferencia para confirmar nuestros resultados respecto a la vía IL-10/STAT3/SOCS-3 evaluando parámetros inflamatorios en los miocardiocitos tratados con IL-10 e infectados. Pudimos comprobar la importancia de la expresión de SOCS-3 inducida por IL-10 ya que el silenciamiento no permitió a IL-10 inhibir la activación de las vías de señalización de ERK1/2 ni de NF- $\kappa$ -B. Más aún, la transfección con siARN-SOCS-3 también revirtió los efectos inhibitorios ejercidos por IL-10 sobre la expresión y actividad de NOS2.

Los resultados obtenidos en este trabajo demuestran que los cultivos primarios de miocardiocitos neonatales responden a la infección con la cepa RA de *T. cruzi* mediante la expresión y activación de enzimas inflamatorias como NOS2, MMP-9 y MMP-2. Además, hemos detectado la producción de los mediadores inflamatorios NO, TNF- $\alpha$  e IL-6 así como activación de las vías de señalización de NF- $\kappa$ B y ERK1/2 MAPK. Dado que esta intensa respuesta inflamatoria puede generar daños irreversibles en el miocardio, evaluamos el efecto modulador de dos mediadores endógenos: el ligando natural de PPAR $\gamma$ , la prostaglandina 15dPGJ2, y la citoquina antiinflamatoria IL-10.

Hemos descripto por primera vez el papel regulador de 15dPGJ2 sobre la expresión de mediadores inflamatorios y sobre el parasitismo en un modelo experimental de infección aguda de miocardiocitos con la cepa RA de *T. cruzi*. Además, dilucidamos los mecanismos de acción de esta prostaglandina, tanto dependientes de su receptor PPAR $\gamma$  como independientes a través de las vías de señalización de NF- $\kappa$ B y ERK1/2. Los resultados obtenidos indican que el tratamiento con 15dPGJ2 podría impedir los daños

celulares en beneficio de la recuperación de la funcionalidad cardíaca frente a la infección con *T. cruzi*.

Por otro lado, dado que los miocardiocitos son un blanco importante de la infección por *T. cruzi* y que produce notables niveles de mediadores inflamatorios en respuesta a la infección, el tratamiento con la citoquina IL-10 podría ejercer efectos beneficiosos sobre el corazón, posiblemente relacionado con sus efectos antiinflamatorios. En este trabajo también demostramos que la presencia de IL-10 es un evento clave para la resolución de la inflamación en la fase aguda de la enfermedad de Chagas. La incubación de los miocardiocitos infectados con IL-10 recombinante de ratón inhibió la respuesta inflamatoria en términos de expresión y actividad de NOS2, MMP-9 y MMP-2. También moduló la síntesis de las citoquinas proinflamatorias TNF- $\alpha$  e IL-6 y la activación de las vías de señalización de NF- $\kappa$ B y ERK1/2 MAPK. Además demostramos mediante la utilización de ARN de interferencia que la expresión de SOCS-3 es un evento clave de la señalización por IL-10 ya que al silenciar su expresión se inhibe la capacidad de IL-10 de inhibir la actividad de las vías de señalización de ERK1/2 MAPK y NF- $\kappa$ B así como la expresión y actividad de NOS2.

Finalmente, los conocimientos adquiridos acerca del papel modulador de 15dPGJ2 e IL-10 sobre los miocardiocitos frente a la infección aguda con *T. cruzi* podrían contribuir al desarrollo de estrategias coadyuvantes de la terapéutica clásica y otorgar protección farmacológica para evitar la evolución hacia formas cardíacas más severas.

**Conclusiones:**

- En este trabajo demostramos que 15dPGJ2, ligando natural de PPAR $\gamma$ , puede modular la respuesta inflamatoria de miocardiocitos infectados con la cepa RA de *T. cruzi*. Esta función reguladora sobre los mediadores inflamatorios es ejercida a través de mecanismos dependientes e independientes de PPAR $\gamma$ . La contribución de su receptor en los efectos ejercidos por 15dPGJ2 fue confirmada mediante el silenciamiento de su expresión (siARN-PPAR $\gamma$ ). Además, a partir de la utilización de inhibidores específicos de ERK1/2 y NF- $\kappa$ B, demostramos también que 15dPGJ2 ejerce sus efectos antiinflamatorios de manera independiente PPAR $\gamma$ , a través de estas vías.
- Los resultados expuestos en este trabajo confirman las propiedades antiinflamatorias y pleiotrópicas de IL-10, ya que esta citoquina fue capaz de modular la expresión y actividad de mediadores inflamatorios en miocardiocitos infectados. Además, en este trabajo se describe que la adición de IL-10 exógena inhibe la activación de las vías de señalización de ERK1/2 y de NF- $\kappa$ B inducidas por la infección. En nuestro modelo de infección aguda con *T. cruzi*, pudimos evidenciar que la expresión de SOCS-3 inducida por STAT3 es responsable de los efectos inhibitorios de IL-10.

- Abdelrahman M, Sivarajah A, Thiemermann C.** 2005. Beneficial effects of PPAR-gamma ligands in ischemia-reperfusion injury, inflammation and shock. *Cardiovasc Res.* 65:772-81.
- 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.* 88:1329-39.
- Aggarwal BB, Kunnumakkara AB, Harikumar KB, Gupta SR, Tharakan ST, Koca C, Dey S, Sung B.** 2009. Signal transducer and activator of transcription-3, inflammation, and cancer: how intimate is the relationship? *Ann N Y Acad Sci.* 1171:59-76.
- Alderton WK, Cooper CE, Knowles RG.** 2001. Nitric oxide synthases: structure, function and inhibition. *Biochem J.* 357:593-615.
- Amir RE, Haecker H, Karin M, Ciechanover A.** 2004. Mechanism of processing of the NF-kappa B2 p100 precursor: identification of the specific polyubiquitin chain-anchoring lysine residue and analysis of the role of NEDD8-modification on the SCF(beta-TrCP) ubiquitin ligase. *Oncogene.* 23:2540-2547.
- Andrade LO, Machado CR, Chiari E, Pena SD, Macedo AM.** 1999. Differential tissue distribution of diverse clones of *Trypanosoma cruzi* in infected mice. *Mol Biochem Parasitol.* 100:163-172.
- Aoki MP, Cano RC, Pellegrini AV, Tanos T, Guiñazú NL, Coso OA, Gea S.** 2006. Different signaling pathways are involved in cardiomyocyte survival induced by a *Trypanosoma cruzi* glycoprotein. *Microbes Infect.* 8:1723-31.
- Aoki MP, Guiñazú NL, Pellegrini AV, Gotoh T, Masih DT, Gea S.** 2004. Cruzipain, a major *Trypanosoma cruzi* antigen, promotes arginase-2 expression and survival of neonatal mouse cardiomyocytes. *Am J Physiol Cell Physiol.* 286:C206-12.
- Bafica A, Santiago HC, Goldszmid R, Ropert C, Gazzinelli RT, Sher A.** 2006. Cutting edge: TLR9 and TLR2 signaling together account for MyD88-dependent control of parasitemia in *Trypanosoma cruzi* infection. *J Immunol.* 177:3515-9.
- Belge C, Massion PB, Pelat M, Balligand JL.** 2005. Nitric oxide and the heart: update on new paradigms. *Ann N Y Acad Sci.* 1047:173-182.
- Benz D, Cadet P, Mantione K, Zhu W, Stefano G.** 2002. Tonal nitric oxide and health: anti-bacterial and -viral actions and implications for HIV. *Med Sci Monit.* 8:RA27-31.
- Berlato C, Cassatella MA, Kinjyo I, Gatto L, Yoshimura A, Bazzoni F.** 2002. Involvement of suppressor of cytokine signaling-3 as a mediator of the inhibitory effects of IL-10 on lipopolysaccharide-induced macrophage activation. *J Immunol.* 168:6404-11.
- Bern C, Montgomery SP, Herwaldt BL, Rassi A Jr, Marin-Neto JA, Dantas RO, Maguire JH, Acquatella H, Morillo C, Kirchhoff LV, Gilman RH, Reyes PA, Salvatella R, Moore AC.** 2007. Evaluation and treatment of Chagas disease in the United States: a systematic review. *JAMA.* 298:2171e81.
- Bern C, Montgomery SP, Katz L, Caglioti S, Stramer SL.** 2008. Chagas disease and the US blood supply. *Curr Opin Infect Dis.* 21:476-82.
- Bishop-Bailey D, Bystrom J.** 2009. Emerging roles of peroxisome proliferator-activated receptor-beta/delta in inflammation. *Pharmacol Ther.* 124:141-50.
- Blum JA, Zellweger MJ, Burri C, Hatz C.** 2008. Cardiac involvement in African and American trypanosomiasis. *Lancet Infect Dis.* 8:631e 41.
- Boldin MP, Baltimore D.** 2012. MicroRNAs, new effectors and regulators of NF-kB. *Immunol Rev.* 246:205-20.

- Bookout AL, Jeong Y, Downes M, Yu RT, Evans RM, Mangelsdorf DJ.** 2006 Anatomical profiling of nuclear receptor expression reveals a hierarchical transcriptional network. *Cell*. 126:789-99
- Bordji K, Grillasca JP, Gouze JN, Magdalou J, Schohn H, Keller JM, Bianchi A, Dauça M, Netter P, Terlain B.** 2000. Evidence for the presence of peroxisome proliferator-activated receptor (PPAR) alpha and gamma and retinoid Z receptor in cartilage. PPARgamma activation modulates the effects of interleukin-1beta on rat chondrocytes. *J Biol Chem*. 275:12243-50.
- Borges DC, Araújo NM, Cardoso CR, Chica JE.** 2012. Different parasite inoculums determine the modulation of the immune response and outcome of experimental *Trypanosoma cruzi* infection. *Immunology*. doi: 10.1111/imm.12022.
- Bougaki M, Searles RJ, Kida K, Yu J, Buys ES, Ichinose F.** 2010. Nos3 protects against systemic inflammation and myocardial dysfunction in murine polymicrobial sepsis. *Shock*. 34:281-90.
- Boyault S, Simonin MA, Bianchi A, Compe E, Liagre B, Mainard D, Bécuwe P, Dauça M, Netter P, Terlain B, Bordji K.** 2001. 15-Deoxy- $\Delta^{12,14}$ -PGJ2, but not troglitazone, modulates IL-1 $\beta$  effects in human chondrocytes by inhibiting NF- $\kappa$ B and AP-1 activation pathways. *FEBS Lett*. 501:24-30.
- 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.
- Brancho D, Tanaka N, Jaeschke A, Ventura JJ, Kelkar N, Tanaka Y, Kyuuma M, Takeshita T, Flavell RA, Davis RJ.** 2003. Mechanism of p38 MAP kinase activation in vivo. *Genes Dev*. 17:1969-1978.
- Bredt DS, Hwang PM, Snyder SH.** 1990. Localization of nitric oxide synthase indicating a neural role for nitric oxide. *Nature*. 347:768-770.
- Bredt DS, Snyder SH.** 1990. Isolation of nitric oxide synthetase, a calmodulin- requiring enzyme. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 87:682-685.
- Brener Z.** 1973. Biology of *Trypanosoma cruzi*. *Annu Rev Microbiol*. 27:347-382.
- Brisse S, Dujardin JC, Tibayrenc M.** 2000. Identification of six *Trypanosoma cruzi* lineages by sequence-characterised amplified region markers. *Mol Biochem Parasitol*. 111:95-105.
- Bruun C, Heding PE, Rønn SG, Frobøse H, Rhodes CJ, Mandrup-Poulsen T, Billestrup N.** 2009. Suppressor of cytokine signalling-3 inhibits Tumor necrosis factor-alpha induced apoptosis and signalling in beta cells. *Mol Cell Endocrinol*. 311:32-8.
- Buscaglia CA, Campo VA, Frasch AC, Di Noia JM.** 2006. *Trypanosoma cruzi* surface mucins: host-dependent coat diversity. *Nat Rev Microbiol*. 4:229-236.
- Caetano BC, Carmo BB, Melo MB, Cerny A, dos Santos SL, Bartholomeu DC, Golenbock DT, Gazzinelli RT.** 2011. Requirement of UNC93B1 reveals a critical role for TLR7 in host resistance to primary infection with *Trypanosoma cruzi*. *J Immunol*. 187:1903-11.
- Cai ZP, Parajuli N, Zheng X, Becker L.** 2012. Remote ischemic preconditioning confers late protection against myocardial ischemia-reperfusion injury in mice by upregulating interleukin-10. *Basic Res Cardiol*. 107:277.
- Camargo MM, Almeida IC, Pereira ME, Ferguson MA, Travassos LR, Gazzinelli RT.** 1997. Glycosylphosphatidylinositol-anchored mucin-like glycoproteins isolated from *Trypanosoma cruzi* trypomastigotes initiate the synthesis of proinflammatory cytokines by macrophages. *J Immunol*. 158:5890-5901.

- Campos MA, Gazzinelli RT.** 2004. *Trypanosoma cruzi* and its components as exogenous mediators of inflammation recognized through Toll-like receptors. *Mediators Inflamm.* 13:139-143.
- Cao X, Tay A, Guy GR, Tan YH.** 1996. Activation and association of Stat3 with Src in v-Src-transformed cell lines. *Mol Cell Biol.* 16:1595-603.
- Capobianco E, White V, Higa R, Martínez N, Jawerbaum A.** 2008. Effects of natural ligands of PPARgamma on lipid metabolism in placental tissues from healthy and diabetic rats. *Mol Hum Reprod.* 14:491-9.
- Carnicer R, Crabtree MJ, Sivakumaran V, Casadei B, Kass DA.** 2012. Nitric Oxide Synthases in Heart Failure. *Antioxid Redox Signal.* PMID: 22871241
- Cassatella MA, Gasperini S, Bovolenta C, Calzetti F, Vollebregt M, Scapini P, Marchi M, Suzuki R, Suzuki A, Yoshimura A.** 1999. Interleukin-10 (IL-10) selectively enhances CIS3/SOCS3 mRNA expression in human neutrophils: evidence for an IL-10-induced pathway that is independent of STAT protein activation. *Blood.* 94:2880-2889.
- Castillo C, López-Muñoz R, Duaso J, Galanti N, Jaña F, Ferreira J, Cabrera G, Maya JD, Kemmerling U.** 2012. Role of matrix metalloproteinases 2 and 9 in ex vivo *Trypanosoma cruzi* infection of human placental chorionic villi. *Placenta.* 33:991-7. doi: 10.1016/j.placenta.2012.10.004.
- Castrillo A, Diaz-Guerra MJ, Hortelano S, Martin-Sanz P, Bosca L.** 2000. Inhibition of I $\kappa$ B kinase and I $\kappa$ B phosphorylation by 15-deoxy- $\Delta^{12,14}$ -prostaglandin J2 in activated murine macrophages. *Mol Cell Biol.* 20:1692-8.
- Cernuda-Morollon E, Pineda-Molina E, Canada FJ, Perez-Sala D.** 2001. 15-Deoxy-D12,14-prostaglandin J2 inhibition of NF- $\kappa$ B-DNA binding through covalent modification of the p50 subunit. *J Biol Chem.* 276:35530-6.
- Cerquetti MC, Hovsepian E, Sarnacki SH, Goren NB.** 2008. Salmonella enterica serovar Enteritidis dam mutant induces low NOS-2 and COX-2 expression in macrophages via attenuation of MAPK and NF-kappaB pathways. *Microbes Infect.* 10:1431-9.
- Chagas C.** 1909. Nova tripanosomiase humana. Estudos sobre a morfologia o ciclo evolutivo do *Schizotrypanum cruzi* N.gen. N.sp., o agente etiológico da nova entidade morbida do homen. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz.* 1: 159-218.
- Chagas C.** 1911. Moléstia de Chagas ou tiroidite parasitária. Nova doenca humana transmitida pelo "barbeiro". Segunda Conferencia Academia Nacional de Medicina. Tipogr. Leuzinger (Río de Janeiro).
- Chandrasekar B, Melby PC, Troyer DA, Colston JT, Freeman GL.** 1998. Temporal expression of pro-inflammatory cytokines and inducible nitric oxide synthase in experimental acute Chagasic cardiomyopathy. *Am J Pathol.* 152:925-34.
- Chapman RE, Scott AA, Deschamps AM, Lowry AS, Stroud RE, Ikonomidis JS, Spinale FG.** 2003. Matrix metalloproteinase abundance in human myocardial fibroblasts: effects of sustained pharmacologic matrix metalloproteinase inhibition. *J Mol Cell Cardiol.* 35:539-548.
- Chen H, He YW, Liu WQ, Zhang JH.** 2008. Rosiglitazone prevents murine hepatic fibrosis induced by *Schistosoma japonicum*. *World J Gastroenterol.* 14:2905-11.
- Chen LF, Greene WC.** 2004. Shaping the nuclear action of NF-kappaB. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 5:392-401.
- Clark RB.** 2002. The role of PPARs in inflammation and immunity. *J Leukoc Biol.* 3:388-400.
- Coker ML, Doscher MA, Thomas CV, Galis ZS, Spinale FG.** 1999. Matrix metalloproteinase synthesis and expression in isolated LV myocyte preparations. *Am J Physiol.* 277:H777-787.

- Collin M, Patel NSA, Dugo L, Thiemermann C.** 2004. Role of peroxisome proliferator-activated receptor-gamma in the protection afforded by 15-Deoxy-delta<sup>12,14</sup> prostaglandin J2 against the multiple organ failure caused by endotoxin. *Crit. Care Med.* 32:826–831.
- Combs CK, Johnson DE, Karlo JC, Cannady SB, Landreth GE.** 2000. Inflammatory mechanisms in Alzheimer's disease: inhibition of beta-amyloid-stimulated proinflammatory responses and neurotoxicity by PPARgamma agonists. *J Neurosci.* 20:558-67.
- Cook R, Wu CC, Kang YJ, Han J.** 2007. The Role of the p38 Pathway in Adaptive Immunity. *Cell Mol Immunol* 4:253-9.
- Corrêa-de-Santana E, Paez-Pereda M, Theodoropoulou M, Kenji Nihei O, Gruebler Y, Bozza M, Arzt E, Villa-Verde DM, Renner U, Stalla J, Stalla GK, Savino W.** 2006. Hypothalamus-pituitary-adrenal axis during *Trypanosoma cruzi* acute infection in mice. *J Neuroimmunol.* 173:12-22.
- Costa GC, da Costa Rocha MO, Moreira PR, Menezes CA, Silva MR, Gollob KJ, Dutra WO.** 2009. Functional IL-10 gene polymorphism is associated with Chagas disease cardiomyopathy. *J Infect Dis.* 199:451-454.
- Creemers EE, Cleutjens JP, Smits JF, Daemen MJ.** 2001. Matrix metalloproteinase inhibition after myocardial infarction: a new approach to prevent heart failure? *Circ Res.* 89:201-210.
- Croker BA, Krebs DL, Zhang JG, Wormald S, Willson TA, Stanley EG, Robb L, Greenhalgh CJ, Förster I, Clausen BE, Nicola NA, Metcalf D, Hilton DJ, Roberts AW, Alexander WS.** 2003. SOCS-3 negatively regulates IL-6 signaling in vivo. *Nat Immunol.* 4:540-5.
- Cuenca J, Goren N, Prieto P, Martín-Sanz P, Boscá L.** 2007. Selective impairment of nuclear factor-kappaB-dependent gene transcription in adult cardiomyocytes: relevance for the regulation of the inflammatory response in the heart. *Am J Pathol.* 171:820-8.
- Cuenca J, Martín-Sanz P, Alvarez-Barrientos AM, Boscá L, Goren N.** 2006. Infiltration of inflammatory cells plays an important role in matrix metalloproteinase expression and activation in the heart during sepsis. *Am J Pathol.* 169:1567-76.
- Cummings KL, Tarleton RL.** 2004. Inducible nitric oxide synthase is not essential for control of *Trypanosoma cruzi* infection in mice. *Infect. Immun.* 72:4081-4089.
- Cura CI, Mejía-Jaramillo AM, Duffy T, Burgos JM, Rodriguero M, Cardinal MV, Kjos S, Gurgel-Gonçalves R, Blanchet D, De Pablos LM, Tomasini N, da Silva A, Russomando G, Cuba CA, Aznar C, Abate T, Levin MJ, Osuna A, Gürtler RE, Diosque P, Solari A, Triana-Chávez O, Schijman AG.** 2010. *Trypanosoma cruzi* I genotypes indifferent geographic regions and transmission cycles based on a microsatellitemotif of the spliced leader genes. *Int J Parasitol.* 40:1599-1607.
- Cutrullis RA, Postan M, Petray PB, Corral RS.** 2009. Timing of expression of inflammatory mediators in skeletal muscles from mice acutely infected with the RA strain of *Trypanosoma cruzi*. *Pathobiology.* 76:170-80.
- Danson EJ, Choate JK, Paterson DJ.** 2005. Cardiac nitric oxide: emerging role for nNOS in regulating physiological function. *Pharmacol Ther.* 106:57-74.
- Daynes RA, Jones DC.** 2002. Emerging roles of PPARs in inflammation and immunity. *Nat Rev Immunol.* 2:748-759.
- de Araújo FF, Corrêa-Oliveira R, Rocha MO, Chaves AT, Fiuza JA, Fares RC, Ferreira KS, Nunes MC, Keesen TS, Damasio MP, Teixeira-Carvalho A, Gomes JA.** 2012. Foxp3+CD25(high) CD4+ regulatory T cells from indeterminate patients with Chagas disease can suppress the effector cells and cytokines and reveal altered correlations with disease severity. *Immunobiology.* 217:768-77.

- de Araújo FF, Vitelli-Avelar DM, Teixeira-Carvalho A, Antas PR, Assis Silva Gomes J, Sathler-Avelar R, Otávio Costa Rocha M, Elói-Santos SM, Pinho RT, Correa-Oliveira R, Martins-Filho OA.** 2011. Regulatory T cells phenotype in different clinical forms of Chagas' disease. *PLoS Negl Trop Dis.* 5:e992.
- de Freitas JM, Augusto-Pinto L, Pimenta JR, Bastos-Rodrigues L, Gonçalves VF, Teixeira SM, Chiari E, Junqueira AC, Fernandes O, Macedo AM, Machado CR, Pena SD.** 2006. Ancestral genomes, sex, and the population structure of *Trypanosoma cruzi*. *PLoS Pathog.* 2:e24.
- de Waal Malefyt R, Abrams RJ, Bennett B, Figdor CG, De Vries JE.** 1991. Interleukin (IL)-10 inhibits cytokine synthesis by hu-man monocytes: an autoregulatory role of IL-10 produced by monocytes. *J Exp Med.* 174:1209-20.
- de Waal Malefyt R, Yssel H, de Vries JE.** 1993. Direct effects of IL-10 on subsets of human CD4+ T cell clones and resting T cells. Specific inhibition of IL-2 production and proliferation. *J Immunol.* 150:4754-4765.
- Delerive P, De Bosscher K, Besnard S, Vanden Berghe W, Peters JM, Gonzalez FJ, Fruchart JC, Tedgui A, Haegeman G, Staels B.** 1999. Peroxisome proliferator-activated receptor alpha negatively regulates the vascular inflammatory gene response by negative cross-talk with transcription factors NF-kappaB and AP-1. *J Biol Chem.* 274:32048-54.
- Deryugina EI, Quigley JP.** 2006. Matrix metalloproteinases and tumor metastasis. *Cancer Metast. Rev.* 25:9-34.
- Deryugina EI, Ratnikov B, Monosov E, Postnova TI, DiScipio R, Smith JW, Strongin AY.** 2001. MT1-MMP initiates activation of pro-MMP-2 and integrin alphavbeta3 promotes maturation of MMP-2 in breast carcinoma cells. *Exp Cell Res.* 263:209-223.
- Ding L, Linsley PS, Huang LY, Germain RN, Shevach EM.** 1993. IL-10 inhibits macrophage costimulatory activity by selectively inhibiting the up-regulation of B7 expression. *J Immunol.* 151:1224-1234.
- Ding L, Shevach EM.** 1992. IL-10 inhibits mitogen-induced T cell proliferation by selectively inhibiting macrophage costimulatory function. *J. Immunol.* 148:3133-3139.
- Ding Y, Chen D, Tarcsafalvi A, Su R, Qin L, Bromberg JS.** 2003. Suppressor of cytokine signaling 1 inhibits IL-10-mediated immune responses. *J Immunol.* 170:1383-1391.
- Donnelly RP, Dickensheets H, Finbloom DS.** 1999. The interleukin-10 signal transduction pathway and regulation of gene expression in mononuclear phagocytes. *J Interferon Cytokine Res.* 19:563-73.
- Durand JL, Mukherjee S, Commodari F, De Souza AP, Zhao D, Machado FS, Tanowitz HB, Jelicks LA.** 2009. Role of NO synthase in the development of *Trypanosoma cruzi*-induced cardiomyopathy in mice. *Am J Trop Med Hyg.* 80:782-7.
- Dutra WO, Rocha MO, Teixeira MM.** 2005. The clinical immunology of human Chagas disease. *Trends Parasitol.* 21:581-7.
- Dvorak JA.** 1984. The natural heterogeneity of *Trypanosoma cruzi*: biological and medical implications. *J Cell Biochem.* 24:357-371.
- Egeblad M, Werb Z.** 2002. New functions for the matrix metalloproteinases in cancer progression. *Nat Rev Cancer.* 2:161-174.
- Engel D, Peshock R, Armstrong RC, Sivasubramanian N, Mann DL.** 2004. Cardiac myocyte apoptosis provokes adverse cardiac remodeling in transgenic mice with targeted TNF overexpression. *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* 287:H1303-11.



**Esper L, Roman-Campos D, Lara A, Brant F, Castro LL, Barroso A, Araujo RR, Vieira LQ, Mukherjee S, Gomes ER, Rocha NN, Ramos IP, Lisanti MP, Campos CF, Arantes RM, Guatimosim S, Weiss LM, Cruz JS, Tanowitz HB, Teixeira MM, Machado FS.** 2012. Role of SOCS2 in modulating heart damage and function in a murine model of acute Chagas disease. *Am J Pathol.* 181:130-40.

**Fahmi H, Di Battista JA, Pelletier JP, Mineau F, Ranger P, Martel-Pelletier J.** 2001. Peroxisome proliferator-activated receptor gamma activators inhibit interleukin-1beta-induced nitric oxide and matrix metalloproteinase 13 production in human chondrocytes. *Arthritis Rheum.* 44:595-607.

**Fajas L, Auboeuf D, Raspé E, Schoonjans K, Lefebvre AM, Saladin R, Najib J, Laville M, Fruchart JC, Deeb S, Vidal-Puig A, Flier J, Briggs MR, Staels B, Vidal H, Auwerx J.** 1997. The organization, promoter analysis, and expression of the human PPARgamma gene. *J Biol Chem.* 272:18779-89.

**Falla A, Herrera C, Fajardo A, Montilla M, Vallejo GA, Guhl F.** 2009. Haplotype identification within *Trypanosoma cruzi* I in Colombian isolates from several reservoirs, vectors and humans. *Acta Trop.* 110:15-21.

**Fang Y, Hu J.** 2011. Toll-like receptor and its roles in myocardial ischemic/reperfusion injury. *Med Sci Monit.* 17:RA100-9.

**Fichera LE, Albareda MC, Laucella SA, Postan M.** 2004. Intracellular growth of *Trypanosoma cruzi* in cardiac myocytes is inhibited by cytokine-induced nitric oxide release. *Infect Immun.* 72:359-363

**Florentino DF, Bond MW, Mosmann TR.** 1989. Two types of mouse T helper cell. IV. Th2 clones secrete a factor that inhibits cytokine production by Th1 clones. *J. Exp. Med.* 170:2081-2095.

**Fitzpatrick FA, Wynalda MA.** 1983. Albumin-catalyzed metabolism of prostaglandin D2. Identification of products formed in vitro. *J Biol Chem.* 258:11713-11718.

**Forman BM, Tontonoz P, Chen J, Brun RP, Spiegelman BM, Evans RM.** 1995. 15-Deoxy- $\Delta^{12,14}$ -prostaglandin J2 is a ligand for the adipocyte determination factor PPAR $\gamma$ . *Cell.* 83:803-812.

**Fraidenraich D, Peña C, Isola EL, Lammel EM, Coso O, Añel AD, Baralle F, Torres HN, Flawia MM.** 1993. An alpha D-globin fragment from *Triatoma infestans* hindgut stimulates *Trypanosoma cruzi* adenylyl cyclase and promotes metacyclogenesis. *Biol. Res.* 26:279-283.

**Frantz S, Hu K, Bayer B, Gerondakis S, Strotmann J, Adamek A, Ertl G, Bauersachs J.** 2006. Absence of NF-kappaB subunit p50 improves heart failure after myocardial infarction. *FASEB J.* 20:1918-20.

**Gachhui R, Abu-Soud HM, Ghosha DK, Presta A, Blazing MA, Mayer B, George SE, Stuehr DJ.** 1998. Neuronal nitric-oxide synthase interaction with calmodulin-troponin C chimeras. *J Biol Chem.* 273:5451-5454.

**Galis ZS, Khatri JJ.** 2002. Matrix metalloproteinases in vascular remodeling and atherogenesis: the good, the bad, and the ugly. *Circ Res.* 90:251-262.

**Gallardo-Soler A, Gomez-Nieto C, Campo ML, Marathe C, Tontonoz P, Castrillo A, Corraliza I.** 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.* 22:1394-1402.

**Gao H, Ward PA.** 2007. STAT3 and suppressor of cytokine signaling 3: potential targets in lung inflammatory responses. *Expert Opin Ther Targets.* 11:869-80.

**Gao W, Pereira MA.** 2002. Interleukin-6 is required for parasite specific response and host resistance to *Trypanosoma cruzi*. *Int J Parasitol.* 32:167-70.

**Gazzinelli RT, Denkers EY.** 2006. Protozoan encounters with Toll-like receptor signalling pathways: implications for host parasitism. *Nat Rev Immunol.* 6:895-906.

**Geppert TD, Whitehurst CE, Thompson P, Beutler B.** 1994. Lipopolysaccharide signals activation of tumor necrosis factor biosynthesis through the ras/raf-1/MEK/MAPK pathway. *Mol Med.* 1:93-103.

- Geurts N, Opdenakker G, Van den Steen PE.** 2012. Matrix metalloproteinases as therapeutic targets in protozoan parasitic infections. *Pharmacol Ther.* 133:257-79.
- Gloire G, Legrand-Poels S, Piette J.** 2006. NF-kappaB activation by reactive oxygen species: fifteen years later. *Biochem Pharmacol.* 72:1493-505.
- Golgher D, Gazzinelli RT.** 2004. Innate and acquired immunity in the pathogenesis of Chagas disease. *Autoimmunity* 37:399-409.
- Gomes JA, Bahia-Oliveira LM, Rocha MO, Martins-Filho OA, Gazzinelli G, Correa-Oliveira R.** 2003. Evidence that development of severe cardiomyopathy in human Chagas' disease is due to a Th1-specific immune response. *Infect Immun.* 71:1185-93.
- González Cappa SM, Bijovsky AT, Freilij H, Muller LA, and Katzin AM.** 1981a. Aislamiento de una cepa de *Trypanosoma cruzi*, predominio de formas delgadas en la Argentina. *Medicina.* 41:119-120.
- González Cappa SM, Katzin AM, Añasco N, Lajmanovich S.** 1981b. Comparative studies on infectivity and surface carbohydrates of several strains of *Trypanosoma cruzi*. *Medicina.* 41:549-55.
- Gordon JW, Shaw JA, Kirshenbaum LA.** 2011. Multiple facets of NF-κB in the heart: to be or not to NF-κB. *Circ Res.* 108:1122-32.
- Goren N, Cuenca J, Martín-Sanz P, Boscá L.** 2004. Attenuation of NF-kappaB signalling in rat cardiomyocytes at birth restricts the induction of inflammatory genes. *Cardiovasc Res.* 64:289-97.
- Gross J, Lapiere CM.** 1962. Collagenolytic activity in amphibian tissues: a tissue culture assay. *Proc Natl Acad Sci USA.* 48:1014-22.
- Gupta S, Barrett T, Whitmarsh AJ, Cavanagh J, Sluss HK, Dérijard B, Davis RJ.** 1996. Selective interaction of JNK protein kinase isoforms with transcription factors. *EMBO J.* 15:2760-70.
- Gutierrez FR, Guedes PM, Gazzinelli RT, Silva JS.** 2009a. The role of parasite persistence in pathogenesis of Chagas heart disease. *Parasite Immunol.* 31:673-685.
- Gutierrez FR, Lalu MM, Mariano FS, Milanezi CM, Cena J, Gerlach RF, Santos JE, Torres-Dueñas D, Cunha FQ, Schulz R, Silva JS.** 2008. Increased activities of cardiac matrix metalloproteinases matrix metalloproteinase (MMP)-2 and MMP-9 are associated with mortality during the acute phase of experimental *Trypanosoma cruzi* infection. *J Infect Dis.* 197:1468-76.
- Gutierrez FR, Mineo TW, Pavanelli WR, Guedes PM, Silva JS.** 2009b. The effects of nitric oxide on the immune system during *Trypanosoma cruzi* infection. *Mem Inst Oswaldo Cruz.* 104:236-45.
- Gwechenberger M, Mendoza LH, Youker KA, Frangogiannis NG, Smith CW, Michael LH, Entman ML.** 1999. Cardiac myocytes produce interleukin-6 in culture and in viable border zone of reperfused infarctions. *Circulation.* 99:546-51.
- Hayden MS, Ghosh S.** 2008. Shared principles in NF-kappaB signaling. *Cell.* 132:344-362.
- He B, You L, Uematsu K, Matsangou M, Xu Z, He M, McCormick F, Jablons DM.** 2003. Cloning and characterization of a functional promoter of the human SOCS-3 gene. *Biochem Biophys Res Commun.* 301:386-91.
- 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.* 20:6862-7.
- Henke BR.** 2004. Peroxisome proliferator-activated receptor alpha/gamma dual agonists for the treatment of type 2 diabetes. *J Med Chem.* 47:4118-27.

- Herrera C, Guhl F, Falla A, Fajardo A, Montilla M, Adolfo Vallejo G, Barges MD.** 2009. Genetic variability and phylogenetic relationships within *Trypanosoma cruzi* I isolated in Colombia based on miniexon gene sequences. *J Parasitol Res.* ID 897364.
- Hickson-Bick DL, Jones C, Buja LM.** 2006. The response of neonatal rat ventricular myocytes to lipopolysaccharide-induced stress. *Shock.* 25:546-52.
- Higuchi M de L, Benvenuti LA, Martins Reis M, Metzger M.** 2003. Pathophysiology of the heart in Chagas' disease: current status and new developments. *Cardiovasc Res.* 60:96-107.
- Hölscher C, Köhler G, Müller U, Mossmann H, Schaub GA, Brombacher F.** 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.* 66:1208-15.
- Honda T, Kaikita K, Tsujita K, Hayasaki T, Matsukawa M, Fuchigami S, Sugiyama S, Sakashita N, Ogawa H, Takeya M.** 2008. Pioglitazone, a peroxisome proliferator-activated receptor-gamma agonist, attenuates myocardial ischemia-reperfusion injury in mice with metabolic disorders. *J Mol Cell Cardiol.* 44:915-26.
- Hotez PJ, Molyneux DH, Fenwick A, Kumaresan J, Sachs SE, Sachs JD, Savioli L.** 2007. Control of neglected tropical diseases. *N Engl J Med.* 357:1018-1027.
- Hovsepian E, Penas F, Goren NB.** 2010. 15-deoxy- $\Delta^{12,14}$ -ProstaglandinJ2 but not rosiglitazone regulates metalloproteinase 9, NOS-2, and cyclooxygenase 2 expression and functions by peroxisome proliferator-activated receptor gamma-dependent and -independent mechanisms in cardiac cells. *Shock.* 34:60-7.
- Huang H, Chan J, Wittner M, Jelicks LA, Morris SA, Factor SM, Weiss LM, Braunstein VL, Bacchi CJ, Yarlett N, Chandra M, Shirani J, Tanowitz HB.** 1999. Expression of cardiac cytokines and inducible form of nitric oxide synthase (NOS2) in *Trypanosoma cruzi*-infected mice. *J Mol Cell Cardiol.* 31:75-88.
- Huang H, Petkova SB, Cohen AW, Bouzahzah B, Chan J, Zhou JN, Factor SM, Weiss LM, Krishnamachary M, Mukherjee S, Wittner M, Kitsis RN, Pestell RG, Lisanti MP, Albanese C, Tanowitz HB.** 2003. Activation of transcription factors AP-1 and NF-kappa B in murine Chagasic myocarditis. *Infect Immun.* 71:2859-67.
- Huang N, Rizshsky L, Hauck CC, Nikolau BJ, Murphy PA, Birt DF.** 2012. The inhibition of lipopolysaccharide-induced macrophage inflammation by 4 compounds in *Hypericum perforatum* extract is partially dependent on the activation of SOCS3. *Phytochemistry.* 76:106-16.
- Hunter CA, Ellis-Neyes LA, Slifer T, Kanaly S, Grünig G, Fort M, Rennick D, Araujo FG.** 1997. IL-10 is required to prevent immune hyperactivity during infection with *Trypanosoma cruzi*. *J Immunol.* 158:3311-6.
- Ichinose F, Buys ES, Neilan TG, Furutani EM, Morgan JG, Jassal DS, Graveline AR, Searles RJ, Lim CC, Kaneki M, Picard MH, Scherrer-Crosbie M, Janssens S, Liao R, Bloch KD.** 2007. Cardiomyocyte-specific overexpression of nitric oxide synthase 3 prevents myocardial dysfunction in murine models of septic shock. *Circ Res.* 100:130-9.
- Ignarro LJ.** 1992. Haem-dependent activation of cytosolic guanylate cyclase by nitric oxide: a widespread signal transduction mechanism. *Biochem Soc Trans.* 20:465-469.
- Isola EL, Lammel EM, González Cappa SM.** 1986. *Trypanosoma cruzi*: differentiation after interaction of epimastigotes and *Triatoma infestans* intestinal homogenate. *Exp. Parasitol.* 62:329-335.
- Issemann I, Green S.** 1990. Activation of a member of the steroid hormone receptor superfamily by peroxisome proliferators. *Nature.* 3476294:645-50.
- Janczewski AM, Kadokami T, Lemster B, Frye CS, McTiernan CF, Feldman AM.** 2003. Morphological and functional changes in cardiac myocytes isolated from mice overexpressing TNF- $\alpha$ . *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* 284:H960-H969.

- Jo D, Liu D, Yao S, Collins RD, Hawiger J.** 2005. Intracellular protein therapy with SOCS3 inhibits inflammation and apoptosis. *Nat Med.* 11:892-8.
- Katzin VJ, Añasco N, de Isola EL, González Cappa SM.** 1983. Characterization of *Trypanosoma cruzi* metacyclic forms differentiated from epimastigotes. A comparative study between both stages. *Rev Inst Med Trop Sao Paulo.* 25:55-61.
- Kaur K, Sharma AK, Dhingra S, Singal PK.** 2006. Interplay of TNF-alpha and IL-10 in regulating oxidative stress in isolated adult cardiac myocytes. *J Mol Cell Cardiol.* 41:1023-30.
- Kawahito Y, Kondo M, Tsubouchi Y, Hashiramoto A, Bishop-Bailey D, Inoue K, Kohno M, Yamada R, Hla T, Sano H.** 2000. 15-deoxy-delta(12,14)-PGJ(2) induces synoviocyte apoptosis and suppresses adjuvant-induced arthritis in rats. *J Clin Invest.* 106:189-97.
- Kim EH, Surh YJ.** 2006. 15-deoxy- $\Delta^{12,14}$ -prostaglandin J2 as a potential endogenous regulator of redox-sensitive transcription factors. *Biochem Pharmacol.* 72:1516-28.
- Kleinert H, Pautz A, Linker K, Schwarz PM.** 2004. Regulation of the expression of inducible nitric oxide synthase. *Eur J Pharmacol.* 500:255-266.
- Kliwer SA, Lenhard JM, Willson TM, Patel I, Morris DC, Lehmann JM.** 1995. A prostaglandin J2 metabolite binds peroxisome proliferator-activated receptor  $\gamma$  and promotes adipocyte differentiation. *Cell.* 83:813-819.
- Knosp CA, Carroll HP, Elliott J, Saunders SP, Nel HJ, Amu S, Pratt JC, Spence S, Doran E, Cooke N, Jackson R, Swift J, Fitzgerald DC, Heaney LG, Fallon PG, Kissenpfennig A, Johnston JA.** 2011. SOCS2 regulates T helper type 2 differentiation and the generation of type 2 allergic responses. *J Exp Med.* 208:1523-1531
- Krishnamurthy P, Rajasingh J, Lambers E, Qin G, Losordo DW, Kishore R.** 2009. IL-10 inhibits inflammation and attenuates left ventricular remodeling after myocardial infarction via activation of STAT3 and suppression of HuR. *Circ Res.* 104:e9–e18.
- Kuhn R, Lohler J, Rennick D, Rajewsky K, Muller W.** 1993. Interleukin-10-deficient mice develop chronic enterocolitis. *Cell.* 75:263-274.
- Lacraz S, Nicod LP, Chicheportiche R, Welgus HG, Dayer JM.** 1995. IL-10 inhibits metalloproteinase and stimulates TIMP-1 production in human mononuclear phagocytes. *J Clin Invest.* 96:2304-10.
- Landreth GE, Heneka MT.** 2001. Anti-inflammatory actions of peroxisome proliferator-activated receptor gamma agonists in Alzheimer's disease. *Neurobiol Aging.* 22:937-44.
- Lang R, Hammer M, Mages J.** 2006. DUSP Meet Immunology: Dual Specificity MAPK Phosphatases in Control of the Inflammatory Response. *J Immunol.* 177:7497-504.
- Lee CH, Chawla A, Urbiztondo N, Liao D, Boisvert WA, Evans RM, Curtiss LK.** 2003. Transcriptional repression of atherogenic inflammation: modulation by PPARdelta. *Science.* 302: 453-7.
- Lee JH, Woo JH, Woo SU, Kim KS, Park SM, Joe E, Jou I.** 2008. The 15-Deoxy-Delta 12, 14-prostaglandin J2 suppresses monocyte chemoattractant protein-1 expression in IFN-gamma-stimulated astrocytes through induction of MAPK phosphatase-1. *J Immunol.* 181:8642-8649.
- Lehrke M, Lazar MA.** 2005. The many faces of PPARgamma. *Cell.* 123:993-9.
- Lemberger T, Desvergne B, Wahli W.** 1996. Peroxisome proliferator-activated receptors: a nuclear receptor signaling pathway in lipid physiology. *Annu Rev Cell Dev Biol.* 12:1355-1363.

- Li YY, Feng YQ, Kadokami T, McTiernan CF, Draviam R, Watkins S.C, Feldman AM.** 2000. Myocardial extracellular matrix remodeling in transgenic mice overexpressing tumor necrosis factor alpha can be modulated by anti-tumor necrosis factor alpha therapy. *Proc Natl Acad Sci USA.* 97:12746-12751.
- Li YY, McTiernan CF, Feldman AM.** 1999. Proinflammatory cytokines regulate tissue inhibitors of metalloproteinases and disintegrin metalloproteinase in cardiac cells. *Cardiovasc Res.* 42:162-172.
- Livak KJ, Schmittgen TD.** 2001. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2<sup>-</sup>(Delta Delta C(T)) Method. *Methods.* 25:402-8.
- Lorenzo O, Picatoste B, Ares-Carrasco S, Ramírez E, Egido J, Tuñón J.** 2011. Potential role of nuclear factor κB in diabetic cardiomyopathy. *Mediators Inflamm.* 2011:652097.
- Luconi M, Cantini G, Serio M.** 2009. Peroxisome proliferator-activated receptor gamma (PPARgamma): Is the genomic activity the only answer?. *Steroids.* 8-9:585-94.
- Machado FS, Aliberti J.** 2006. Impact of lipoxin-mediated regulation on immune response to infectious disease. *Immunol Res.* 35:209-218.
- Machado FS, Johndrow JE, Esper L, Dias A, Bafica A, Serhan CN, Aliberti J.** 2006. Anti-inflammatory actions of lipoxin A4 and aspirin-triggered lipoxin are SOCS-2 dependent. *Nat Med.* 12:330–334.
- Machado FS, Martins GA, Aliberti JC, Mestriner FL, Cunha FQ, Silva JS.** 2000. *Trypanosoma cruzi*-infected cardiomyocytes produce chemokines and cytokines that trigger potent nitric oxide-dependent trypanocidal activity. *Circulation.* 102:3003-8.
- Machado FS, Souto JT, Rossi MA, Esper L, Tanowitz HB, Aliberti J, Silva JS.** 2008. Nitric oxide synthase-2 modulates chemokine production by *Trypanosoma cruzi*-infected cardiac myocytes. *Microbes Infect.* 10:1558-1566.
- MacMicking J, Xie QW, Nathan C.** 1997. Nitric oxide and macrophage function. *Annu Rev Immunol.* 15:323-350.
- Maggini J, Mirkin G, Bognanni I, Holmberg J, Piazzón IM, Nepomnaschy I, Costa H, Cañones C, Raiden S, Vermeulen M, Geffner JR.** 2010. Mouse bone marrow-derived mesenchymal stromal cells turn activated macrophages into a regulatory-like profile. *PLoS One.* 5:e9252.
- Mangelsdorf DJ, Thummel C, Beato M, Herrlich P, Schutz G, Umesono K, Blumberg B, Kastner P, Mark M, Chambon P, Evans RM.** 1995. The nuclear receptor superfamily; the second decade. *Cell.* 83:835–839.
- Manque PA, Probst CM, Pereira MC, Rampazzo RC, Ozaki LS, Pavoni DP, Silva Neto DT, Carvalho MR, Xu P, Serrano MG, Alves JM, Meirelles Mde N, Goldenberg S, Krieger MA, Buck GA.** 2011. *Trypanosoma cruzi* infection induces a global host cell response in cardiomyocytes. *Infect Immun.* 79:1855-62.
- Marie C, Roman-Roman S, Rawadi G.** 1999. Involvement of mitogen-activated protein kinase pathways in interleukin-8 production by human monocytes and polymorphonuclear cells stimulated with lipopolysaccharide or *Mycoplasma fermentans* membrane lipoproteins. *Infect Immun.* 67:688-93.
- Marin-Neto JA, Cunha-Neto E, Maciel BC, Simões MV.** 2007. Pathogenesis of chronic Chagas heart disease. *Circulation.* 115:1109-23.
- Martínez N, Capobianco E, White V, Pustovrh MC, Higa R, Jawerbaum A.** 2008. Peroxisome proliferator-activated receptor alpha activation regulates lipid metabolism in the fetoplacental unit from diabetic rats. *Reproduction.* 136:95-103.
- Marx N, Schonbeck U, Lazar MA, Libby P, Plutzky J.** 1998. Peroxisome proliferator-activated receptor γ activators inhibit gene expression and migration in human vascular smooth muscle cells. *Circ Res.* 83:1097-1103.

- Marx N, Sukhova GK, Collins T, Libby P, Plutzky J.** 1999. PPARalpha activators inhibit cytokine-induced vascular cell adhesion molecule-1 expression in human endothelial cells. *Circulation*. 99:3125-31.
- Massion PB, Feron O, Dessy C, Balligand JL.** 2003. Nitric oxide and cardiac function: ten years after, and continuing. *Circ Res*. 93:388-398.
- Mayer B, Hemmens B.** 1997. Biosynthesis and action of nitric oxide in mammalian cells. *Trends Biochem Sci*. 22:477-481
- Mazighi M, Pellé A, Gonzalez W, Mtairag el M, Philippe M, Hénin D, Michel JB, Feldman LJ.** 2004. IL-10 inhibits vascular smooth muscle cell activation in vitro and in vivo. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. 287:H866-71.
- Mazza S.** 1934. Casos agudos benignos de enfermedad de Chagas comprobados en la provincia de Jujuy. *MePRA*. 17: 3-11.
- 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.
- Mazza S, Montana A, Benitez C, Junín E.** 1936. Transmisión de *Schizotyparum cruzi* al niño por la leche de la madre con enfermedad de Chagas. *Publ MEPRA*. 28:41-46.
- Michalik L, Wahli W.** 2006. Involvement of PPAR nuclear receptors in tissue injury and wound repair. *J Clin Invest*. 116:598-606.
- Misra A, Haudek SB, Knuefermann P, Vallejo JG, Chen ZJ, Michael LH, Sivasubramanian N, Olson EN, Entman ML, Mann DL.** 2003. Nuclear factor-kappaB protects the adult cardiac myocyte against ischemia-induced apoptosis in a murine model of acute myocardial infarction. *Circulation*. 108:3075-8.
- Mohammed FF, Smookler DS, Khokha R.** 2003. Metalloproteinases, inflammation and rheumatoid arthritis. *Ann Rheum Dis*. 62:1143-7.
- Moore KW, de Waal Malefyt R, Coffman RL, O'Garra A.** 2001. Interleukin-10 and the interleukin-10 receptor. *Annu Rev Immunol*. 19:683-765.
- Moraes LA, Piqueras L, Bishop-Bailey D.** 2006. Peroxisome proliferator-activated receptors and inflammation. *Pharmacol Ther*. 110:371-85.
- Moreno S, Farioli-Vecchioli S, Cerù MP.** 2004. Immuno localization of peroxisome proliferator-activated receptors and retinoid X receptors in the adult rat CNS. *Neuroscience*. 123:131-45.
- Morillas P, de Andrade H, Castillo J, Quiles J, Bertomeu-González V, Cordero A, Tarazón E, Roselló E, Portolés M, Rivera M, Bertomeu-Martínez V.** 2012. Inflammation and Apoptosis in Hypertension. Relevance of the Extent of Target Organ Damage. *Rev Esp Cardiol*. 65:819-825.
- Morishita R, Sugimoto T, Aoki M, Kida I, Tomita N, Moriguchi A, Maeda K, Sawa Y, Kaneda Y, Higaki J, Ogihara T.** 1997. In vivo transfection of cis element "decoy" against nuclear factor-kappaB binding site prevents myocardial infarction. *Nat Med*. 3:894-9.
- Moss NC, Stansfield WE, Willis MS, Tang RH, Selzman CH.** 2007. IKKbeta inhibition attenuates myocardial injury and dysfunction following acute ischemia-reperfusion injury. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. 293:H2248-53.
- Nagase H.** 1998. Cell surface activation of progelatinaseA (proMMP-2) and cell migration. *Cell Res*. 8:179-186.
- Nagase H, Woessner JF.** 1999. Matrix metalloproteinases. *J Biol Chem*. 274:21491-21494.

- Nair S, Pandey AD, Mukhopadhyay S.** 2011. The PPE18 protein of *Mycobacterium tuberculosis* inhibits NF- $\kappa$ B/rel-mediated proinflammatory cytokine production by upregulating and phosphorylating suppressor of cytokine signaling 3 protein. *J Immunol.* 186:5413-24.
- Nakajima A, Wada K, Miki H, Kubota N, Nakajima N, Terauchi Y, Ohnishi S, Saubermann LJ, Kadowaki T, Blumberg RS, Nagai R, Matsuhashi N.** 2001. Endogenous PPAR gamma mediates anti-inflammatory activity in murine ischemia-reperfusion injury. *Gastroenterology.* 120:460-9.
- Nguyen M, Arkell J, Jackson CJ.** 2000. Activated protein C directly activates human endothelial gelatinase A. *J Biol Chem.* 275:9095-9098.
- Nicholson SE, De Souza D, Fabri LJ, Corbin J, Willson TA, Zhang JG, Silva A, Asimakis M, Farley A, Nash AD, Metcalf D, Hilton DJ, Nicola NA, Baca M.** 2000. Suppressor of cytokine signaling-3 preferentially binds to the SHP-2-binding site on the shared cytokine receptor subunit gp130. *Proc Natl Acad Sci USA.* 97:6493.
- Niemand C, Nimmesgern A, Haan S, Fischer P, Schaper F, Rossaint R, Heinrich PC, Müller-Newen G.** 2003. Activation of STAT3 by IL-6 and IL-10 in primary human macrophages is differentially modulated by suppressor of cytokine signaling 3. *J Immunol.* 170:3263-72.
- N.R.N. Committee.** A unified nomenclature system for the nuclear receptor superfamily. 1999. *Cell.* 97:161-163.
- Nussler AK, Billiar T R.** 1993. Inflammation, immunoregulation, and inducible nitric oxide synthase. *J Leukoc Biol.* 54:171-178.
- O'Farrell AM, Liu Y, Moore KW, Mui AL.** 1998. IL-10 inhibits macrophage activation and proliferation by distinct signaling mechanisms: evidence for Stat3-dependent and -independent pathways. *EMBO J.* 17:1006-8.
- Opendakker G, Van den Steen PE, Van Damme J.** 2001. Gelatinase B: a tuner and amplifier of immune functions. *Trends Immunol.* 22:571-579.
- Pahl HL.** 1999. Activators and target genes of Rel/NF- $\kappa$ B transcription factors. *Oncogene.* 18:6853-6866.
- Pearson G, Robinson F, Gibson B, Xu B-E, Karandikar M, Berman K, Cobb MH.** 2001. Mitogen-activated protein (MAP) kinase pathways: Regulation and physiological functions. *Endocrine Reviews.* 22:153-183.
- Penas F, Mirkin GA, Hovsepian E, Cevey A, Caccuri R, Sales ME, Goren NB.** 2012. PPAR $\gamma$  ligand treatment inhibits cardiac inflammatory mediators induced by infection with different lethality strains of *Trypanosoma cruzi*. *Biochim Biophys Acta* 1832:239-248.
- Perez-Sala D, Cernuda-Morollon E, Canada FJ.** 2003. Molecular basis for the direct inhibition of AP-1 DNA binding by 15-deoxy-D12,14-prostaglandin J2. *J Biol Chem.* 278:51251-60.
- Phatharajaree W, Phrommintikul A, Chattipakorn N.** 2007. Matrix metalloproteinases and myocardial infarction. *Can J Cardiol.* 23:727-33.
- Piccard H, Van den Steen PE, Opendakker G.** 2007. Hemopexin domains as multifunctional liganding modules in matrix metalloproteinases and other proteins. *J Leukoc Biol.* 81:870-892.
- Pinto AM, Sales PC, Camargos ER, Silva AM.** 2011. Tumour necrosis factor (TNF)-mediated NF- $\kappa$ B activation facilitates cellular invasion of non-professional phagocytic epithelial cell lines by *Trypanosoma cruzi*. *Cell Microbiol.* 13:1518-29.
- Ponce NE, Cano RC, Carrera-Silva EA, Lima AP, Gea S, Aoki MP.** 2012. Toll-like receptor-2 and interleukin-6 mediate cardiomyocyte protection from apoptosis during *Trypanosoma cruzi* murine infection. *Med Microbiol Immunol.* 201:145-55.

- Poncini CV, Giménez G, Pontillo CA, Alba-Soto CD, de Isola EL, Piazzón I, Cappa SM.** 2010. Central role of extracellular signal-regulated kinase and Toll-like receptor 4 in IL-10 production in regulatory dendritic cells induced by *Trypanosoma cruzi*. *Mol Immunol.* 47:1981-8.
- Postan M, Arnaiz MR, Fichera LE.** 1999. Myocardial cell response to *Trypanosoma cruzi* infection. *Medicina.* 59:57-62.
- Pouysségur J, Lenormand P.** 2003. Fidelity and spatio-temporal control in MAP kinase (ERKs) signalling. *Eur J Biochem.* 270:3291-9.
- Poynter ME, Daynes RA.** 1998. Peroxisome proliferator-activated receptor alpha activation modulates cellular redox status, represses nuclear factor-kappaB signaling, and reduces inflammatory cytokine production in aging. *J Biol Chem.* 273:32833-41.
- Prata A.** 2001. Clinical and epidemiological aspects of Chagas disease. *Lancet Infect Dis.* 1:92-100.
- Pustovrh MC, Capobianco E, Martínez N, Higa R, White V, Jawerbaum A.** 2009. MMP/ TIMP balance is modulated in vitro by 15dPGJ(2) in fetuses and placentas from diabetic rats. *Eur J Clin Invest.* 39:1082-90.
- Pyper SR, Viswakarma N, Yu S, Reddy JK.** 2002. PPAR $\alpha$ : energy combustion, hypolipidemia, inflammation and cancer. *Nucl Recep Signal.* 8:2002.
- Qasimi P, Ming-Lum A, Ghanipour A, Ong CJ, Cox ME, Ihle J, Cacalano N, Yoshimura A, Mui AL.** 2006. Divergent mechanisms utilized by SOCS3 to mediate interleukin-10 inhibition of tumor necrosis factor alpha and nitric oxide production by macrophages. *J Biol Chem.* 281:6316-24.
- Rassi A Jr, Rassi A, Marin-Neto JA.** 2010. Chagas disease. *The Lancet.* 9723:1388-1402.
- Rassi A Jr, Rassi A, Rassi SG.** 2007. Predictors of mortality in chronic Chagas disease: a systematic review of observational studies. *Circulation.* 115:1101e8.
- Raychaudhuri B, Fisher CJ, Farver CF, Malur A, Drazba J, Kavuru MS, Thomassen MJ.** 2000. Interleukin 10 (IL-10)-mediated inhibition of inflammatory cytokine production by human alveolar macrophages. *Cytokine.* 12:1348-1355.
- Reilly CM, Oates JC, Cook JA, Morrow JD, Halushka PV, Gilkeson GS.** 2000. Inhibition of mesangial cell nitric oxide in MRL/lpr mice by prostaglandin J2 and proliferator activation receptor-gamma agonists. *J Immunol.* 164:1498-504.
- Reilly CM, Oates JC, Sudian J, Crosby MB, Halushka PV, Gilkeson GS.** 2001. Prostaglandin J(2) inhibition of mesangial cell iNOS expression. *Clin Immunol.* 98:337-45.
- Ren Y, Sun C, Sun Y, Tan H, Wu Y, Cui B, Wu Z.** 2009. PPAR gamma protects cardiomyocytes against oxidative stress and apoptosis via Bcl-2 upregulation. *Vascul Pharmacol.* 51:169-74.
- Rennick D, Davidson N, Berg D.** 1995. Interleukin-10 gene knockout mice: a model of chronic inflammation. *Clin Immunol Immunopathol.* 76:S174-S1748.
- Reyes PA, Vallejo M.** 2005. Trypanocidal drugs for late stage, symptomatic Chagas disease (*Trypanosoma cruzi* infection). *Cochrane Database Syst Rev.* CD004102.
- Rico-Bautista E, Flores-Morales A, Fernandez-Perez L.** 2006. Suppressor of cytokine signaling (SOCS) 2, a protein with multiple functions. *Cytokine Growth Factor Rev.* 17:431-439
- Ricote M, Li AC, Willson TM, Kelly CJ, Glass CK.** 1998. The peroxisome proliferator-activated receptor- $\gamma$  is a negative regulator of macrophage activation. *Nature.* 391:79-82.



Rival Y, Benéteau N, Taillandier T, Pezet M, Dupont-Passelaigue E, Patoiseau JF, Junquéro D, Colpaert FC, Delhon A. 2002. PPARalpha and PPARdelta activators inhibit cytokine-induced nuclear translocation of NF-kappaB and expression of VCAM-1 in EAhy926 endothelial cells. *Eur J Pharmacol.* 435:143-51.

Rocha Rodrigues DB, dos Reis MA, Romano A, Pereira SA, Teixeira Vde P, Tostes S Jr, Rodrigues V Jr. 2012. In situ expression of regulatory cytokines by heart inflammatory cells in Chagas' disease patients with heart failure. *Clin Dev Immunol.* doi: 10.1155/2012/361730.

Rodrigues MM, Ribeirão M, Boscardin SB. 2000. CD4 Th1 but not Th2 clones efficiently activate macrophages to eliminate *Trypanosoma cruzi* through a nitric oxide dependent mechanism. *Immunol Lett.* 73:43-50.

Roffé E, Rothfuchs AG, Santiago HC, Marino AP, Ribeiro-Gomes FL, Eckhaus M, Antonelli LR, Murphy PM. 2012. IL-10 limits parasite burden and protects against fatal myocarditis in a mouse model of *Trypanosoma cruzi* infection. *J Immunol.* 188:649-60.

Roman-Campos D, Sales-Junior P, Duarte HL, Gomes ER, Lara A, Campos P, Rocha NN, Resende RR, Ferreira A, Guatimosim S, Gazzinelli RT, Ropert C, Cruz JS. 2012. Novel insights into the development of chagasic cardiomyopathy: Role of PI3Kinase/NO axis. *Int J Cardiol.* 10.1016/j.ijcard.2012.09.020.

Romaña C. 1963. Enfermedad de Chagas. López Libreros Editores, Buenos Aires.

Ropert C, Gazzinelli RT. 2000. Signaling of immune system cells by glycosylphosphatidylinositol (GPI) anchor and related structures derived from parasitic protozoa. *Curr Opin Microbiol.* 3:395-403.

Rossi A, Kapahi P, Natoli G, Takahashi T, Chen Y, Karin M, Santoro MG. 2000. Anti-inflammatory cyclopentenone prostaglandins are direct inhibitors of IkappaB kinase. *Nature.* 403:103-108.

Rousset F, Garcia E, Defrance T, Péronne C, Vezzio N, Hsu DH, Kastelein R, Moore KW, Banchereau J. 1992. Interleukin 10 is a potent growth and differentiation factor for activated human B lymphocytes. *Proc Natl Acad Sci USA.* 89:1890-1893.

Roy R, Zhang B, Moses MA. 2006. Making the cut: Protease-mediated regulation of angiogenesis. *Exp Cell Res.* 312:608-22.

Russomando G, de Tomassone MM, de Guillen I, Acosta N, Vera N, Almiron M, Candia N, Calcena MF, Figueredo A. 1998. Treatment of congenital Chagas' disease diagnosed and followed up by the polymerase chain reaction. *Am J Trop Med Hyg.* 59:487-91.

Saccani S, Pântano S, Natoli G. 2003. Modulation of NF-kappaB activity by exchange of dimers. *Mol Cell.* 11:1563-1574.

Saklatvala J, Dean J, Clark A. 2003. Control of the expression of inflammatory response genes. *Biochem Soc Symp.* 70:95-106.

Sawano H, Haneda M, Sugimoto T, Inoki K, Koya D, Kikkawa R. 2002. 15-Deoxy- $\Delta^{12,14}$ -prostaglandin J2 inhibits IL-1 $\beta$  induced cyclooxygenase-2 expression in mesangial cells. *Kidney Int.* 61:1957-67.

Scher JU, Pillinger MH. 2005. 15d-PGJ2: The anti-inflammatory prostaglandin? *Clin Immunol.* 114:100-9.

Schmitz J, Weissenbach M, Haan S, Heinrich PC, Schaper F. 2000. SOCS3 exerts its inhibitory function on interleukin-6 signal transduction through the SHP2 recruitment site of gp130. *J Biol Chem.* 275:12848.

Schmitz ML, Baeuerle PA. 1991. The p65 subunit is responsible for the strong transcription activating potential of NF-kappa B. *Embo J.* 10:3805-3817.

Schmunis GA. 1999. Prevention of transfusional *Trypanosoma cruzi* infection in Latin America. *Mem Inst Oswaldo Cruz.* 94:93-101.

- Sen R, Baltimore D.** 1986. Multiple nuclear factors interact with the immunoglobulin enhancer sequences. *Cell.* 46:705-716.
- Serfling E, Berberich-Siebelt F, Avots A, Chuvpilo S, Klein-Hessling S, Jha MK, Kondo E, Pagel P, Schulze-Luehrmann J, Palmetshofer A.** 2004. NFAT and NF-kappaB factors-the distant relatives. *Int J Biochem Cell Biol.* 367:1166-70.
- Shames BD, Selzman CH, Meldrum DR, Pulido EJ, Barton HA, Meng X, Harken AH, McIntyre RC Jr.** 1998. Interleukin-10 stabilizes inhibitory kappaB-alpha in human monocytes. *Shock.* 10:389-394.
- Shibata Y, Foster LA, Kurimoto M, Okamura H, Nakamura RM, Kawajiri K, Justice JP, Van Scott MR, Myrvik QN, Metzger WJ.** 1998. Immunoregulatory roles of IL-10 in innate immunity: IL-10 inhibits macrophage production of IFN-gamma-inducing factors but enhances NK cell production of IFN-gamma. *J Immunol.* 161:4283-8.
- Shouda T, Yoshida T, Hanada T, Wakioka T, Oishi M, Miyoshi K, Komiya S, Kosai K, Hanakawa Y, Hashimoto K, Nagata K, Yoshimura A.** 2001. Induction of the cytokine signal regulator SOCS3/CIS3 as a therapeutic strategy for treating inflammatory arthritis. *J Clin Invest.* 108:1781-88
- Silva JS, Morrissey PJ, Grabstein KH, Mohler KM, Anderson D, Reed SG.** 1992. Interleukin 10 and interferon gamma regulation of experimental *Trypanosoma cruzi* infection. *J Exp Med.* 175:169-74.
- Silva JS, Twardzik DR, Reed SG.** 1991. Regulation of *Trypanosoma cruzi* infections in vitro and in vivo by transforming growth factor beta (TGF-beta). *J Exp Med.* 174:539-45.
- Silva JS, Vespa GN, Cardoso MA, Aliberti JC, Cunha FQ.** 1995. Tumor necrosis factor alpha mediates resistance to *Trypanosoma cruzi* infection in mice by inducing nitric oxide production in infected gamma interferon-activated macrophages. *Infect Immun.* 63:4862-7.
- Siwik DA, Chang DL, Colucci WS.** 2000. Interleukin-1beta and tumor necrosis factor alpha decrease collagen synthesis and increase matrix metalloproteinase activity in cardiac fibroblasts *in vitro*. *Circ Res.* 86:1259-1265.
- Soares MB, Silva-Mota KN, Lima RS, Bellintani MC, Pontes-de-Carvalho L, Ribeiro-dos-Santos R.** 2001. Modulation of chagasic cardiomyopathy by interleukin-4: dissociation between inflammation and tissue parasitism. *Am J Pathol.* 159:703-9.
- Sopata I, Danczewicz AM.** 1974. Presence of a gelatin-specific proteinase and its latent form in human leucocytes. *Biochim Biophys Acta.* 370:510-523.
- Souza PE, Rocha MO, Rocha-Vieira E, Menezes CA, Chaves AC, Gollob KJ, Dutra WO.** 2004. Monocytes from patients with indeterminate and cardiac forms of Chagas' disease display distinct phenotypic and functional characteristics associated with morbidity. *Infect Immun.* 72:5283-91.
- Stahl A, Joyal JS, Chen J, Sapieha P, Juan AM, Hatton CJ, Pei DT, Hurst CG, Seaward MR, Krah NM, Dennison RJ, Greene ER, Boscolo E, Panigrahy D, Smith LE.** 2012. SOCS3 is an endogenous inhibitor of pathologic angiogenesis. *Blood.* 120:2925-9.
- Stahl N, Farrugella TJ, Boulton TG, Zhong Z, Darnell JE Jr, Yancopoulos GD.** 1995. Choice of STATs and other substrates specified by modular tyrosine-based motifs in cytokine receptors. *Science.* 267:1349.
- Starr R, Willson TA, Viney EM, Murray LJJ, Rayner JR, Jenkins BJ, Gonda TJ, Alexander WS, Metcalf D, Nicola NA, Hilton DJ.** 1997. A family of cytokine-inducible inhibitors of signalling. *Nature.* 386:917-921.
- Stoiber D, Kovarik P, Cohnhey S, Johnston JA, Steinlein P, Decker T.** 1999. Lipopolysaccharide induces in macrophages the synthesis of the suppressor of cytokine signaling 3 and suppresses signal transduction in response to the activating factor IFN-gamma. *J Immunol.* 163:2640-2647.
- Straus DS, Glass CK.** 2007. Anti-inflammatory actions of PPAR ligands: new insights on cellular and molecular mechanisms. *Trends Immunol.* 28:551-558.

- Straus DS, Pascual G, Li M, Welch JS, Ricote M, Hsiang CH, Sengchanthalangsy LL.** 2000. 15-Deoxy- $\Delta^{12,14}$ -prostaglandin J2 inhibits multiple steps in the NF- $\kappa$ B signaling pathway. *Proc Natl Acad Sci USA.* 97:4844-9.
- Su CG, Lewis JD.** 2001. Antineoplastic and anti-inflammatory effects of PPAR ligands in colitis. *Gastroenterology.* 121:1019-21.
- Su CG, Wen X, Bailey ST, Jiang W, Rangwala SM, Keilbaugh SA, Flanigan A, Murthy S, Lazar MA, Wu GD.** 1999. A novel therapy for colitis utilizing PPAR-gamma ligands to inhibit the epithelial inflammatory response. *J Clin Invest.* 104:383-9.
- Sugden PH, Clerk A.** 1998a. Cellular mechanisms of cardiac hypertrophy. *J Mol Med.* 76:725–746.
- Sugden PH, Clerk A.** 1998b. “Stress-responsive” mitogen-activated protein kinases (c-Jun N-terminal kinases and p38 mitogen-activated protein kinases) in the myocardium. *Circ Res.* 83:345–352.
- Sun SC.** 2011. Non-canonical NF- $\kappa$ B signaling pathway. *Cell Res.* 21:71-85.
- Takano H, Komuro I.** 2009. Peroxisome proliferator-activated receptor gamma and cardiovascular diseases. *Circ J.* 73:214-20.
- Takano H, Nagai T, Asakawa M, Toyozaki T, Oka T, Komuro I, Saito T, Masuda Y.** 2000. Peroxisome proliferator-activated receptor activators inhibit lipopolysaccharide-induced tumor necrosis factor- $\alpha$  expression in neonatal rat cardiac myocytes. *Circ Res.* 87:596-602.
- Takeda K, Clausen BE, Kaisho T, Tsujimura T, Terada N, Forster I, Akira S.** 1999. Enhanced Th1 activity and development of chronic enterocolitis in mice devoid of Stat3 in macrophages and neutrophils. *Immunity.* 10:39-49.
- Tanowitz HB, Machado FS, Jelicks LA, Shirani J, de Carvalho AC, Spray DC, Factor SM, Kirchhoff LV, Weiss LM.** 2009. Perspectives on *Trypanosoma cruzi*-induced heart disease (Chagas disease). *Prog Cardiovasc Dis.* 51:524-39.
- Tarleton RL.** 2007. Immune system recognition of *Trypanosoma cruzi*. *Curr Opin Immunol* 19:430-434.
- Teixeira MM, Gazzinelli RT, Silva JS.** 2002. Chemokines, inflammation and *Trypanosoma cruzi* infection. *Trends Parasitol.* 18:262–265.
- Thompson M, Cockerill G.** 2006. Matrix metalloproteinase-2: the forgotten enzyme in aneurysm pathogenesis. *Ann N Y Acad Sci.* 1085:170-4.
- Thompson-Snipes L, Dhar V, Bond MW, Mosmann TR, Moore KW, Rennick DM.** 1991. Interleukin 10: a novel stimulatory factor for mast cells and their progenitors. *J Exp Med.* 173:507-510.
- Tibayrenc M, Ayala FJ.** 1999. Evolutionary genetics of *Trypanosoma* and *Leishmania*. *Microbes Infect.* 1:465-472.
- Torre-Amione G, Kapadia S, Lee J, Bies RD, Lebovitz R, Mann DL.** 1995. Expression and functional significance of tumor necrosis factor receptors in human myocardium. *Circulation.* 92:1487–1493.
- Torrice F, Alonso-Vega C, Suarez E, Rodriguez P, Torrico MC, Dramaix M, Truyens C, Carlier Y.** 2004. Maternal *Trypanosoma cruzi* infection, pregnancy outcome, morbidity, and mortality of congenitally infected and non-infected newborns in Bolivia. *Am J Trop Med Hyg.* 70:201-09.
- Trocoli Torrecilhas AC, Tonelli RR, Pavanelli WR, da Silva JS, Schumacher RI, de Souza W, E Silva NC, de Almeida Abrahamsohn I, Colli W, Manso Alves MJ.** 2009. *Trypanosoma cruzi*: parasite shed vesicles increase heart parasitism and generate an intense inflammatory response. *Microbes Infect.* 11:29-39.

- Tsuruda T, Costello-Boerrigter LC, Burnett JC Jr.** 2004. Matrix metalloproteinases: pathways of induction by bioactive molecules. *Heart Fail.* 9:53-61.
- Vallabhapurapu S, Karin M.** 2009. Regulation and function of NFkappaB transcription factors in the immune system. *Annu Rev Immunol.* 27:693-733.
- Van den Steen PE, Proost P, Wuyts A, Van Damme J, Opdenakker G.** 2000. Neutrophil gelatinase B potentiates interleukin-8 tenfold by aminoterminal processing, whereas it degrades CTAP-III, PF-4, and GRO-alpha and leaves RANTES and MCP-2 intact. *Blood.* 96:2673-2681.
- van der Bruggen T, Nijenhuis S, van Raaij E, Verhoef J, van Asbeck BS.** 1999. Lipopolysaccharide-induced tumor necrosis factor alpha production by human monocytes involves the raf-1/MEK1-MEK2/ERK1-ERK2 pathway. *Infect Immun.* 67:3824-9.
- Vanhoutte D, Heymans S.** 2010. TIMPs and cardiac remodeling: 'Embracing the MMP-independent-side of the family. *J Mol Cell Cardiol.* 48:445-53.
- Vazquez-Torres A, Stevanin T, Jones-Carson J, Castor M, Read RC, Fang FC.** 2008. Analysis of nitric oxide-dependent antimicrobial actions in macrophages and mice. *Methods Enzymol.* 437:521-38.
- Veenbergen S, Bennink MB, Affandi AJ, Bessis N, Biton J, Arntz OJ, van den Berg WB, van de Loo FA.** 2011. A pivotal role for antigen-presenting cells overexpressing SOCS3 in controlling invariant NKT cell responses during collagen-induced arthritis. *Ann Rheum Dis.* 70:2167-75.
- Venturini G, Salvati L, Muolo M, Colasanti M, Gradoni L, Ascenzi P.** 2000. Nitric oxide inhibits cruzipain, the major papain-like cysteine proteinase from *Trypanosoma cruzi*. *Biochem Biophys Res Commun.* 270:437-41.
- Vera Marcela.** 2012. Papel de los ligandos de receptores PPARy y PPARα en la modulación de mediadores inflamatorios en macrófagos infectados con cepas de distinta letalidad de *Trypanosoma cruzi*. Tesis de Licenciatura en Genética. Universidad Nacional de Misiones.
- Vespa GN, Cunha FQ, Silva JS.** 1994. Nitric oxide is involved in control of *Trypanosoma cruzi*-induced parasitemia and directly kills the parasite in vitro. *Infect Immun.* 62:5177-5182.
- Vu TH, Werb Z.** 2000. Matrix metalloproteinases: effectors of development and normal physiology. *Genes Dev.* 14:2123-33.
- Wada K, Nakajima A, Blumberg RS.** 2001. PPARgamma and inflammatory bowel disease: a new therapeutic target for ulcerative colitis and Crohn's disease. *Trends Mol Med.* 7:329-31.
- Wainszelbaum MJ, Belaunzarán ML, Lammel EM, Florin-Christensen M, Florin-Christensen J, Isola EL.** 2003. Free fatty acids induce cell differentiation to infective forms in *Trypanosoma cruzi*. *Biochem J.* 375:705-712.
- Wang P, Wu P, Siegel MI, Egan RW, Billah MM.** 1995. Interleukin (IL)-10 inhibits nuclear factor kappa B (NF kappa B) activation in human monocytes. IL-10 and IL-4 suppress cytokine synthesis by different mechanisms. *J Biol Chem.* 270:9558-9563.
- Weber-Nordt RM, Riley JK, Greenlund AC, Moore KW, Darnell JE, Schreiber RD.** 1996. Stat3 recruitment by two distinct ligand-induced, tyrosine-phosphorylated docking sites in the interleukin-10 receptor intracellular domain. *J Biol Chem.* 271:27954-61.
- Wehinger J, Gouilleux F, Groner B, Finke J, Mertelsmann R, Weber-Nordt RM.** 1996. IL-10 induces DNA binding activity of three STAT proteins (Stat1, Stat3, and Stat5) and their distinct combinatorial assembly in the promoters of selected genes. *FEBS Lett.* 394:365-370.
- Weih F, Caamaño J.** 2003. Regulation of secondary lymphoid organ development by the nuclear factor-kappaB signal transduction pathway. *Immunol Rev.* 195:91-105.

**Wieser F, Waite L, Depoix C, Taylor RN.** 2008. PPAR Action in Human Placental Development and Pregnancy and Its Complications. *PPAR Res.* 2008:527048.

**Williams LM, Bradley L, Smith A, Foxwell B.** 2004. Signal transducer and activator of transcription 3 is the dominant mediator of the anti-inflammatory effects of IL-10 in human macrophages. *J Immunol.* 172:567–576.

**Williams LM, Sarma U, Willets K, Smallie T, Brennan F, Foxwell BM.** 2007. Expression of constitutively active STAT3 can replicate the cytokine-suppressive activity of interleukin-10 in human primary macrophages. *J Biol Chem.* 282:6965-6975.

**Woodiwiss AJ, Tsotetsi OJ, Sprott S, Lancaster EJ, Mela T, Chung ES, Meyer TE, Norton GR.** 2001. Reduction in myocardial collagen cross-linking parallels left ventricular dilatation in rat models of systolic chamber dysfunction. *Circulation.* 103:155-160.

**World Health Organization.** 2005. Chagas's disease. Seventeenth Programme Report. Progress 2003-2004.

**Wu TT, Chen TL, Loon WS, Tai YT, Cherng YG, Chen RM.** 2011. Lipopolysaccharide stimulates syntheses of toll-like receptor 2 and surfactant protein-A in human alveolar epithelial A549 cells through upregulating phosphorylation of MEK1 and ERK1/2 and sequential activation of NF-κB. *Cytokine.* 55:40-7.

[www.cdc.gov/parasites/chagas/health\\_professionals/tx.html](http://www.cdc.gov/parasites/chagas/health_professionals/tx.html)

[www.dpd.cdc.gov/dpdx/HTML/TrypanosomiasisAmerican.htm](http://www.dpd.cdc.gov/dpdx/HTML/TrypanosomiasisAmerican.htm)

[www.who.int/mediacentre/factsheets/fs340/en/index.html](http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs340/en/index.html). Chagas Disease (American Trypanosomiasis). Fact sheet N°340. August 2012.

**Yasukawa H, Ohishi M, Mori H, Murakami M, Chinen T, Aki D, Hanada T, Takeda K, Akira S, Hoshijima M, Hirano T, Chien KR, Yoshimura A.** 2003. IL-6 induces an anti-inflammatory response in the absence of SOCS3 in macrophages. *Nat Immunol.* 4:551-6.

**Yki-Järvinen H.** 2004. Thiazolidinediones. *N Engl J Med.* 351:1106-18.

**Yndestad A, Damás JK, Ore E, Ueland T, Gullestad L, Aukrust P.** 2007. Role of inflammation in the progression of heart failure. *Curr Cardiol Rep.* 9:236-41.

**Yoshida N, Tyler KM, Llewellyn MS.** 2011. Invasion mechanisms among emerging food-borne protozoan parasites. *Trends parasitol.* 10:459-66.

**Youssef J, Badr M.** 2011. Peroxisome proliferator-activated receptors and cancer: challenges and opportunities. *Br J Pharmacol.* 164:68-82.

**Zeledón R, Rabinovich JE.** 1981. Chagas' disease: an ecological appraisal with special emphasis on its insect vectors. *Annu Rev Entomol.* 26:101-33.

**Zhong Z, Wen Z, Darnell JE Jr.** 1994. Stat3: a STAT family member activated by tyrosine phosphorylation in response to epidermal growth factor and interleukin-6. *Science.* 264:95-8.

**Zingales B, Andrade SG, Briones MR, Campbell DA, Chiari E, Fernandes O, Guhl F, Lages-Silva E, Macedo AM, Machado CR, Miles MA, Romanha AJ, Sturm NR, Tibayrenc M, Schijman AG.** 2009. A new consensus for *Trypanosoma cruzi* intraspecific nomenclature: second revision meeting recommends TcI to TcVI. *Mem. Inst Oswaldo Cruz.* 104:1051-1054.

**Ziolo MT, Kohr MJ, Wang H.** 2008. Nitric oxide signaling and the regulation of myocardial function. *J Mol Cell Cardiol.* 45:625-32