



UNIVERSIDAD DE BUENOS AIRES

Facultad de Ciencias Exactas y Naturales

Departamento de Química Biológica

**Modulación por el fenofibrato de la respuesta inflamatoria y la
patología cardíaca en ratones infectados con *Trypanosoma
cruzi*: mecanismos dependientes e independientes de IL-10**

Tesis presentada para optar al título de Doctora de la Universidad de Buenos Aires
en el área Química Biológica

Lic. María Jimena Rada

Directora de tesis: Dra. Nora Beatriz Goren

Director Adjunto de tesis: Dr. Gerardo Ariel Mirkin

Consejero de Estudios: Dr. Norberto Zwirner

Lugar de trabajo:

Instituto de Investigaciones en Microbiología y Parasitología Médica (IMPaM). UBA - CONICET.

Instituto de Investigaciones Biomédicas en Retrovirus y SIDA (INBIRS). UBA - CONICET.

Buenos Aires, 2024

A Luchi y Orli

Quiero agradecer a todas las personas que me acompañaron en esta montaña rusa de emociones, de desafíos, de aprendizaje y crecimiento personal y profesional.

A todos los que trabajaron y trabajan en los dos institutos donde realicé mi doctorado: INBIRS e IMPAM. Gracias!

A mis directores Nora y Gerardo, gracias por incorporarme al grupo de trabajo y por ayudar a formarme en el ámbito científico. Por su paciencia. Gracias a mis compañeros de grupo, por guiarme en los primeros días y por la compañía a lo largo de estos años.

A todas las personas que colaboraron con el trabajo de tesis, miles de gracias!

A todos los becarios con los que compartí. Por las charlas, las risas, por acompañarnos, por los mates. Y en especial a los que hoy tengo la suerte de llamar amigos.

A mis amigos, los que están cerca y los que están desparramados por el mundo. Gracias por el aliento, el apoyo, los consejos y por caminar a mi lado. Los adoro.

A mi grupo de trabajo en CASASCO, gracias por haber compartido dos años de trabajo, y por su apoyo. Por los almuerzos más llenos de risas que tuve!.

A mi familia, por ser incondicional. No hay palabras que alcancen para describir mi agradecimiento con ustedes. En especial a mis viejos, gracias!!!. Los amo.

A Daniel, mi compañero de vida. Gracias por tu compañía y amor.

Gracias a todos!

Modulación por el fenofibrato de la respuesta inflamatoria y la patología cardíaca en ratones infectados con *Trypanosoma cruzi*: mecanismos dependientes e independientes de IL-10

La enfermedad de Chagas, causada por *Trypanosoma cruzi* (*T. cruzi*), es la principal causa de miocardiopatía dilatada en América. Durante la fase crónica, la persistencia parasitaria y el intenso infiltrado inflamatorio inducen, progresivamente, la remodelación cardíaca que afecta de forma severa la funcionalidad del corazón en, aproximadamente, un 30% de los pacientes.

Frente a la infección se desencadena una respuesta inmune tanto innata como adaptativa que apuntan al control de la carga parasitaria, en tejidos sólidos y sangre periférica. Sin embargo, estos mecanismos no evitan la persistencia parasitaria ni sus consecuencias.

Los receptores activados por factores de proliferación peroxisomal α (PPAR α) son factores de transcripción dependientes de ligandos que intervienen en la homeostasis lipídica y en la regulación de procesos inflamatorios modulando la producción de mediadores inflamatorios.

En este trabajo de tesis se evaluaron los efectos de fenofibrato, un ligando sintético de PPAR α , en la modulación de la respuesta inflamatoria frente a la infección con *T. cruzi* con la perspectiva de evitar o limitar el daño cardíaco, al ser empleado como coadyuvante de la terapia parasiticida clásica. Para llevar a cabo la primera parte de este trabajo se utilizó un modelo de infección desarrollado en nuestro laboratorio con dos cepas de *T. cruzi* de distinta virulencia (modelo de infección mixta, en ratones BALB/c) que reproduce algunas características clínicas de la etapa crónica sintomática de la enfermedad.

Los resultados de la primera parte mostraron que la infección induce un aumento de mediadores pro-inflamatorios en tejido cardíaco y linfoide y a nivel sistémico, y que fenofibrato es capaz de inhibir dicho aumento. Además, evaluamos el porcentaje de células T reguladoras (Treg) y la expresión de su marcador FOXP3, en tejido linfoide y en tejido cardíaco. Determinamos que ni la infección ni el tratamiento tuvieron impacto sobre el porcentaje de linfocitos T CD4⁺ CD25⁺ CD39⁺ CD73⁺ FOXP3⁺ de tejido linfoide o sobre la expresión de FOXP3 en corazón y bazo. Asimismo, basándonos en que existe un balance entre las células Treg y las células T helper 17 (Th17), evaluamos la expresión de ROR γ t, factor de transcripción que caracteriza a los linfocitos Th17. La expresión de éste aumentó con la infección y fue modulado por fenofibrato.

Se ha descrito que la citoquina anti-inflamatoria interleuquina 10 (IL-10), juega un rol fundamental en la resolución de procesos inflamatorios. En el modelo en estudio observamos

que la infección promueve el aumento de la expresión de esta citoquina y de su receptor en el corazón, y que fenofibrato potencia aún más dicho incremento. Asimismo, en el corazón se observó que fenofibrato aumentó la expresión de marcadores de perfil reparador (M2) en macrófagos. Los resultados obtenidos sugieren que el tratamiento con fenofibrato mejora la funcionalidad cardíaca, fenómeno asociado a la modulación de la respuesta inflamatoria frente a *T. cruzi*, promoviendo un perfil reparador en el corazón.

En base a estos resultados, nos propusimos evaluar el rol de IL-10 en los efectos de fenofibrato, sobre la modulación de la respuesta inmune, y la remodelación y funcionalidad cardíaca frente a la infección con *T. cruzi*. Se utilizaron ratones BALB/c modificados genéticamente o *knockout* para IL-10 (IL-10 KO), y ratones BALB/c *wild type* (WT) como control. Se evaluó la tasa de supervivencia de los ratones IL-10 KO frente a la infección mixta y determinamos que esta disminuyó drásticamente luego de la infección con la segunda cepa de *T. cruzi*, sugiriendo que la segunda infección promueve un perfil altamente inflamatorio, en ausencia de IL-10, que no es resuelto por otros mecanismos moduladores de la inflamación. A partir de estos resultados, decidimos infectar los ratones IL-10 KO y los WT (como control) solo con el clon K98 de la cepa CA-I de baja virulencia. En este modelo de infección pudimos observar que los ratones IL-10 KO son capaces de tolerar la infección, sobreviviendo a la misma, aunque desarrollando patología cardíaca evidenciada por la disminución de parámetros de la función ventricular. En este modelo, los resultados ecocardiográficos mostraron que el tratamiento con fenofibrato restaura la función ventricular.

La infección con *T. cruzi* indujo un infiltrado inflamatorio en el tejido cardíaco de ratones IL-10 KO, promoviendo a su vez un aumento de marcadores de perfil M2. Sin embargo, el tratamiento con fenofibrato no fue capaz de reducir el infiltrado inflamatorio ni de potenciar aún más la expresión de los marcadores M2. Más aún, la infección generó áreas con signos de fibrosis en el tejido cardíaco, acompañados por el aumento de la relación peso del corazón y peso corporal y de la expresión de TGF β . Significativamente, el fenofibrato fue capaz de revertir estos efectos en ratones IL-10 KO.

En el mismo modelo evaluamos la expresión de mediadores pro-inflamatorios tanto en corazón como a nivel sistémico. La infección provocó un aumento de los mediadores en el tejido y a nivel sistémico en ratones IL-10 KO, que fueron inhibidos por el tratamiento con fenofibrato. También se evaluó la actividad de la creatina kinasa (CK) en suero, enzima indicadora de injuria cardíaca. Este estudio reveló que el tratamiento con fenofibrato fue capaz de revertir el aumento de esta enzima provocado por la infección en ratones IL-10 KO.

Al igual que en el modelo de infección mixta decidimos evaluar la expresión de ROR γ t y FOXP3. Los resultados mostraron que, al igual que en el modelo de infección mixta, la expresión de

FOXP3 no es alterada ni por la infección ni por fenofibrato, en tanto que la expresión de ROR γ t aumenta con la infección y el fenofibrato logra inhibirla.

En cuanto a los ratones WT, utilizados como control, observamos que la infección no alteró los parámetros cardíacos, por lo cual inferimos que no provocó disfunción ventricular. Los resultados de la segunda parte de la tesis mostraron que la IL-10 es esencial para la modulación de los infiltrados inflamatorios en el tejido cardíaco y para la expresión de marcadores M2. Por el contrario, el fenofibrato es capaz de revertir la disfunción ventricular y modular la expresión de mediadores pro-inflamatorios, la actividad de CK, la expresión de ROR γ t y la fibrosis en ausencia de IL-10.

En conjunto los resultados demuestran que el fenofibrato reduce o inhibe la expresión de mediadores pro-inflamatorios a nivel tisular y sistémico; también de modula el perfil Th17 mediante la inhibición de la expresión de ROR γ t, IL-6 y TGF β , aún en ausencia de IL-10.

En síntesis, el fenofibrato ejerce sus efectos de manera dependiente e independiente de IL-10, para promover una mejora en la funcionalidad cardíaca frente a la infección por *T. cruzi*.

El conocimiento más profundo de los mecanismos de acción de fenofibrato podría contribuir al desarrollo de estrategias terapéuticas que, en conjunto con tratamiento tripanocida, limiten la inflamación exacerbada responsable, al menos en parte, de la disfunción cardíaca que acompaña a la enfermedad de Chagas crónica en un número significativo de pacientes.

Palabras clave: *Trypanosoma cruzi*, fenofibrato, IL-10, Cardiopatía Chagásica, respuesta inflamatoria, ratones IL-10 KO.

Modulation of the inflammatory response and cardiac pathology by fenofibrate in mice infected with *Trypanosoma cruzi*: IL-10 dependent and independent mechanisms

Chagas disease, caused by *Trypanosoma cruzi* (*T. cruzi*), is the main cause of dilated cardiomyopathy in Latin America. During the chronic phase, parasitic persistence and intense inflammatory infiltrates progressively induce cardiac remodeling, that severely affects heart function in approximately 30% of patients.

In the face of infection, an innate and adaptive immune response is triggered that aims to control the parasite load in tissues and peripheral blood. However, these mechanisms neither prevent parasite persistence nor its consequences.

Peroxisomal proliferation-activated receptors α (PPAR α) are ligand-dependent transcription factors involved in lipid homeostasis and in the regulation of inflammatory processes by modulating the production of inflammatory mediators.

In this thesis, the effects of fenofibrate, a synthetic ligand of PPAR α , in the modulation of the inflammatory response against infection with *T. cruzi* were evaluated with the perspective of avoiding or limiting cardiac damage, when used as an adjuvant of classical parasiticide therapy. To carry out the first part of this work, an infection model developed in our laboratory with two strains of *T. cruzi* of different virulence (mixed infection model, in BALB/c mice) was used, which reproduces some of the clinical characteristics of the symptomatic chronic disease stage. The results of the first part showed that the infection induces an increase in pro-inflammatory mediators in cardiac and lymphoid tissue and at the systemic level, and that fenofibrate is capable of inhibiting this increase. In addition, we evaluated the percentage of Treg cells and the expression of their marker FOXP3, in cardiac and lymphoid tissues. Neither infection nor treatment had an impact on the percentage of CD4⁺ CD25⁺ CD39⁺ CD73⁺ FOXP3⁺ T cells in lymphoid tissue or on FOXP3 expression in the heart. Likewise, based on the fact that there is a balance between Treg cells and T helper 17 (Th17) cells, we evaluated the expression of ROR γ t, a transcription factor that characterizes Th17 lymphocytes. Its expression increased with infection and was modulated by fenofibrate.

It has been described that the anti-inflammatory cytokine interleukin 10 (IL-10) plays a fundamental role in the resolution of inflammatory processes. In the model under study, we observed that the infection promotes an increase in the expression of this cytokine and its

receptor in the heart, and that fenofibrate enhances this increase even more. Similarly, we observed that fenofibrate increased the expression of reparative profile markers (M2) in macrophages, in the heart. The results obtained suggest that treatment with fenofibrate improves cardiac functionality, a phenomenon associated with the modulation of the inflammatory response against *T. cruzi*, promoting a reparative profile in the heart.

Based on these results, we sought to evaluate the role of IL-10 in the effects of fenofibrate on the modulation of the immune response, and cardiac remodeling and function upon *T. cruzi* infection. Genetically modified or IL-10 knockout (IL-10 KO) BALB/c mice while *wild type* (WT) BALB/c mice were used as controls. The survival rate of IL-10 KO mice against mixed infection was evaluated and we determined that it decreased drastically after infection with the second strain of *T. cruzi*, suggesting that the second infection promotes a highly inflammatory profile, in the absence of IL-10, which is not resolved by other mechanisms that modulate inflammation. Therefore, we decided to infect IL-10 KO and syngeneic WT mice (as control) only with the low virulence strain CA-I clone K98. In this infection model, we observed that IL-10 KO mice are capable of enduring the infection, surviving, but still developing cardiac pathology evidenced by the decrease in ventricular function parameters. In this model, echocardiographic results showed that fenofibrate treatment restores ventricular function.

Infection with *T. cruzi* induced inflammatory infiltrates in heart tissue of IL-10 KO mice, in turn promoting an increase in M2 profile markers. However, treatment with fenofibrate was unable to reduce the inflammatory infiltrate or further enhance the expression of M2 markers. Furthermore, the infection generated areas with signs of fibrosis in the cardiac tissue, accompanied by an increase in the heart weight to body weight ratio and in the expression of TGF β . Significantly, fenofibrate was able to reverse these effects in IL-10 KO mice.

In the same model we evaluated the expression of pro-inflammatory mediators both in the heart and at the systemic level. Infection caused an increase in tissue and systemic mediators in IL-10 KO mice, which were inhibited by fenofibrate treatment. Serum creatine kinase (CK) activity, an enzyme indicative of cardiac injury, was also evaluated. This study revealed that fenofibrate treatment was able to reverse the increase of this enzyme, caused by the infection in IL-10 KO mice.

As in the mixed infection model, we decided to evaluate the expression of ROR γ t and FOXP3. The results showed that, as in the mixed infection model, the expression of FOXP3 is not altered by the infection or by fenofibrate treatment, while the expression of ROR γ t increases with the infection and fenofibrate manages to inhibit it. Regarding the WT mice, used as control, we observed that the infection did not alter the cardiac parameters, whereby we infer

that it did not cause ventricular dysfunction. The results of the second part of the thesis showed that IL-10 is essential for the modulation of inflammatory infiltrates in cardiac tissue and for the expression of M2 markers. In contrast, fenofibrate can reverse ventricular dysfunction and module the expression of pro-inflammatory mediators, CK activity, ROR γ t expression, and fibrosis in the absence of IL-10. Altogether, these results show that fenofibrate reduces or inhibits the expression of pro-inflammatory mediators at the tissue and systemic levels; it also modulates the Th17 profile by inhibiting the expression of ROR γ t, IL-6 and TGF β , even in the absence of IL-10. In short, fenofibrate exerts its effects in an IL-10-dependent and -independent manner, to promote an improvement in cardiac function against *T. cruzi* infection. A deeper understanding of the mechanisms of action of fenofibrate could contribute to the development of therapeutic strategies that, together with trypanocidal treatment, limit the exacerbated inflammation responsible, at least in part, for the cardiac dysfunction that accompanies chronic Chagas disease in a significant number of patients.

Key words: *Trypanosoma cruzi*, fenofibrate, IL-10, Chagas heart disease, inflammatory response.

Publicaciones realizadas durante el período de tesis

IL-10-Dependent and -Independent Mechanisms Are Involved in the Cardiac Pathology. Modulation Mediated by Fenofibrate in an Experimental Model of Chagas Heart Disease.

Rada J, Donato M, Penas FN, Alba Soto C, Cevey AC, Pieralisi AV, Gelpi R, Mirkin GA, Goren NB. Front Immunol. 2020 Sep 24;11:572178. doi: 10.3389/fimmu.2020.572178. eCollection 2020.

Pyridinecarboxylic Acid Derivative Stimulates Pro-Angiogenic Mediators by PI3K/AKT/mTOR and Inhibits Reactive Nitrogen and Oxygen Species and NF-κB Activation Through a PPARγ-Dependent Pathway in *T. cruzi*-Infected Macrophages. Penas FN, Carta D, Cevey AC, Rada MJ, Pieralisi AV, Ferlin MG, Sales ME, Mirkin GA, Goren NB.

Front Immunol. 2020 Jan 9;10:2955. doi: 10.3389/fimmu.2019.02955. eCollection 2019.

Treatment with a new peroxisome proliferator-activated receptor gamma agonist, pyridinecarboxylic acid derivative, increases angiogenesis and reduces inflammatory mediators in the heart of *Trypanosoma cruzi*-infected mice.

Penas FN, Carta D, Dmytrenko G, Mirkin GA, Modenutti CP, Cevey AC, Rada MJ, Ferlin MG, Sales ME, Goren NB.

Front Immunol. 2017 Dec 11;8:1738. doi: 10.3389/fimmu.2017.01738. eCollection 2017.

Treatment with Fenofibrate plus a low dose of Benznidazole attenuates cardiac dysfunction in experimental Chagas disease.

Cevey AC, Mirkin GA, Donato M, Rada MJ, Penas FN, Gelpi RJ, Goren NB.

Int J Parasitol Drugs Drug Resist. 2017 Dec;7(3):378-387. doi: 10.1016/j.ijpddr.2017.10.003. Epub 2017 Oct 7.

INDICE DE CONTENIDOS

INTRODUCCIÓN	1
1. Enfermedad de Chagas	2
1.1. Características generales	2
1.2. Agente etiológico	2
1.2.1. <i>Morfología y ciclo de vida</i>	2
1.2.2. <i>Diversidad Biológica</i>	4
1.3 Epidemiología.....	5
1.4. Vías de transmisión	6
1.4.1. <i>Vía vectorial</i>	7
1.4.2. <i>Vía vertical o congénita</i>	7
1.4.3. <i>Vía transfusional</i>	8
1.4.4. <i>Transmisión por trasplante de órganos</i>	8
1.4.5. <i>Vía oral</i>	8
1.5. Curso clínico de la enfermedad: Fases de la infección	8
1.6. Cardiomiopatía Chagásica Crónica	9
1.7. Tratamiento etiológico	10
2. Inmunidad frente a la infección por <i>Trypanosoma cruzi</i>	11
2.1. Características generales de la respuesta inmune	11
2.1.1. <i>Comportamiento de la respuesta inmune frente a la infección con T. cruzi en las fases aguda y crónica asintomática: características generales</i>	11
2.1.2. <i>Inmunidad frente a la infección por Trypanosoma cruzi en la etapa crónica sintomática de la infección</i>	12
2.1.3. <i>Macrófagos</i>	14
2.1.4. <i>Mediadores inflamatorios y pro-fibróticos</i>	15

2.2. Balance Treg/Th17.....	17
2.3. Interleuquina 10 y su papel en la respuesta inmune frente a <i>Trypanosoma cruzi</i>	18
3.PPAR y agonistas	19
3.1. Características generales	19
3.2. PPAR α	20
3.3. Fenofibrato.....	21
OBJETIVOS.....	23
MATERIALES Y MÉTODOS.....	25
1.Ratones	26
1.1. Ratones CF1.....	26
1.2. Ratones BALB/c	26
2.Cepas de <i>Trypanosoma cruzi</i>	26
2.1. Cepa CA-I clon K98.....	26
2.2. Cepa RA	26
2.3. Obtención de <i>Trypanosoma cruzi</i> en estadio tripomastigote	27
3.Modelo murinos de infección	27
3.1. Modelo de infección mixta con dos cepas de <i>Trypanosoma cruzi</i>	27
3.2. Modelo de infección con el clon K98 de <i>Trypanosoma cruzi</i> en ratones IL-10 KO	28
4. Detección de la parasitemia	28
5. Registro del peso corporal y del corazón	28
6. Supervivencia	29
7. Ecocardiografía.....	29
8. Citometría	29
9. Histología	31

9.1. Hematoxilina-eosina	32
9.2. Rojo Picrosirio	32
10. Cuantificación relativa de ARN mensajero	32
10.1. Extracción de ARN total y cuantificación	32
10.2. Retrotranscripción a ADN complementario	32
10.3. qRT-PCR.....	32
10.4. Primers	33
11. Extracción de proteínas totales.....	34
12. Cuantificación de proteínas	35
13. Western Blot	35
14. ELISA	35
15. Actividad sérica de Creatina Kinasa.....	36
16. Análisis estadísticos	36
RESULTADOS	37
CAPÍTULO 1:.....	38
1. ROL DE FENOFIBRATO EN LA MODULACIÓN DE LA RESPUESTA INMUNE	38
1.1. Modelo murino de infección mixta y tratamiento: Antecedentes	38
1.2. Efecto del tratamiento con fenofibrato sobre el balance Treg/Th17.	43
1.3 Efecto del fenofibrato sobre IL-10 y su receptor	50
1.4. Efecto del tratamiento con fenofibrato sobre la expresión de marcadores de perfil reparador.	51
CAPÍTULO 2.....	52
2. EFECTOS ANTI-INFLAMATORIOS DEL TRATAMIENTO CON FENOFIBRATO DEPENDIENTES E INDEPENDIENTES DE IL-10.	52
2.1. Evaluación del modelo de infección mixta en ratones IL-10 KO.....	52

2.2. Modelo de infección con el clon K98 de la cepa CA-I de <i>Trypanosoma cruzi</i> en ratones IL-10 KO.....	54
2.3. Papel de fenofibrato sobre infiltrados inflamatorios en corazones de ratones IL-10 KO.....	56
2.4. Evaluación del efecto de fenofibrato sobre la fibrosis cardíaca	58
2.5. Expresión de citoquinas pro-inflamatorias y efecto del tratamiento con fenofibrato	60
2.6. Relación entre mediadores pro-inflamatorios y disfunción ventricular. Efecto del tratamiento con fenofibrato	63
2.7. Efecto del tratamiento con fenofibrato sobre la expresión de marcadores de perfil reparador en ratones IL-10 KO	66
2.8. Efecto del tratamiento con fenofibrato sobre la expresión de ROR γ t y FOXP3 en el corazón de ratones IL-10 KO	66
DISCUSIÓN.....	68
BIBLIOGRAFÍA.....	74
ANEXO	100

INTRODUCCIÓN

1. Enfermedad de Chagas

1.1. Características generales

La enfermedad de Chagas, conocida también como tripanosomiasis americana, es una enfermedad sistémica y crónica causada por la infección con el parásito protozoario *Trypanosoma cruzi* (*T. cruzi*). Esta patología es transmitida por varias especies de insectos triatominos hematófagos (vulgarmente conocidos como vinchucas) y sostenida por reservorios mamíferos entre los que se encuentra el ser humano, sobre todo en áreas endémicas (Echeverría et al. 2019).

La enfermedad de Chagas, el vector y el agente etiológico fueron descritos por el médico e investigador Carlos Chagas en 1909 (Chagas 1909). En 1926 el médico argentino Salvador Mazza describió la magnitud de la dispersión de la endemia en Argentina, Bolivia y Paraguay.

El control del vector es el método más utilizado para evitar la transmisión. En este sentido el análisis de sangre es importante para evitarla en caso de transfusión sanguínea o un trasplante de órgano, así como también el análisis y el diagnóstico en embarazadas y niños son medidas de control de la infección y transmisión (<https://www.who.int/news-room/questions-and-answers/item/chagas-disease>)

1.2. Agente etiológico

Trypanosoma cruzi es un parásito intracelular perteneciente al orden Kinetoplastida, grupo ampliamente distribuido de protozoos que poseen uno o dos flagelos y una estructura morfológica distinguible: el kinetoplasto (condensación de ADN, ADNk).

1.2.1. Morfología y ciclo de vida

T. cruzi presenta un ciclo de vida complejo que involucra la alternancia entre dos hospedadores, un mamífero y un insecto triatomino. El protozoario sufre cambios biológicos para poder adaptarse al ambiente de cada uno de sus hospedadores, presentando tres estadios morfológicos con características estructurales y metabólicas propias. El amastigote es una forma replicativa, que puede o no ser infectiva, no posee flagelo libre y el kinetoplasto se encuentra cerca del núcleo (Fig. 1). El epimastigote es la forma replicativa no infectiva, el kinetoplasto tiene una ubicación central anterior al núcleo; el flagelo emerge del medio del parásito formando una membrana ondulante (Fig. 1). El tripomastigote es la forma infectiva no replicativa, el kinetoplasto es posterior al núcleo y el flagelo sale de la parte posterior del parásito y se une a la membrana conformando una estructura ondulante (Fig. 1).

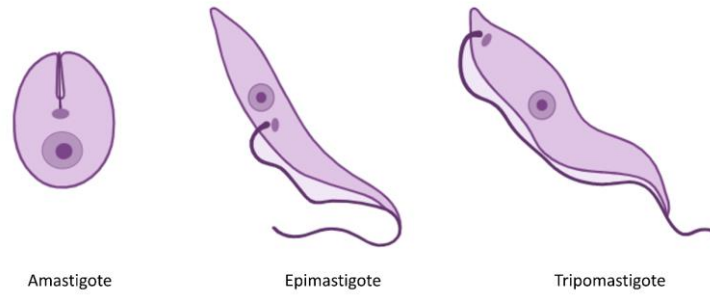


Fig. 1: Morfología de *Trypanosoma cruzi*.

El ciclo de infección de *T. cruzi* tiene lugar una vez que el vector triatmino se alimenta de la sangre de un hospedador mamífero infectado. Durante la ingesta de sangre succiona tripomastigotes sanguíneos (forma infectiva para el vector) que al llegar al intestino medio se diferencian a epimastigotes (forma multiplicativa en el triatmino). Luego de varios ciclos de multiplicación por fisión binaria migran al intestino posterior y se diferencian a tripomastigotes metacíclicos que serán excretados en las heces del triatmino cuando realice la próxima ingesta de alimento.

El ciclo en el hospedador mamífero ocurre cuando los tripomastigotes excretados en las heces del insecto, ingresan a través de la herida provocada por la picadura u otras lesiones en piel o a través de las mucosas provocando la infección. Los parásitos invaden inmediatamente las células del sitio de inoculación. Los tripomastigotes son capaces de infectar una amplia variedad de células nucleadas. Luego de ingresar a la célula, los tripomastigotes se diferencian a amastigotes (forma multiplicativa) que se dividirán por fisión binaria durante varios ciclos. Posteriormente, los amastigotes sufren la diferenciación a tripomastigotes y la célula infectada se lisa liberando los parásitos, que pueden invadir células vecinas o ingresar al torrente circulatorio y diseminarse por el organismo hacia otros órganos y tejidos, invadiendo sus células.

El ciclo de vida se completa cuando un vector se alimenta de un hospedador mamífero que tiene tripomastigotes en su torrente sanguíneo (Fig. 2).

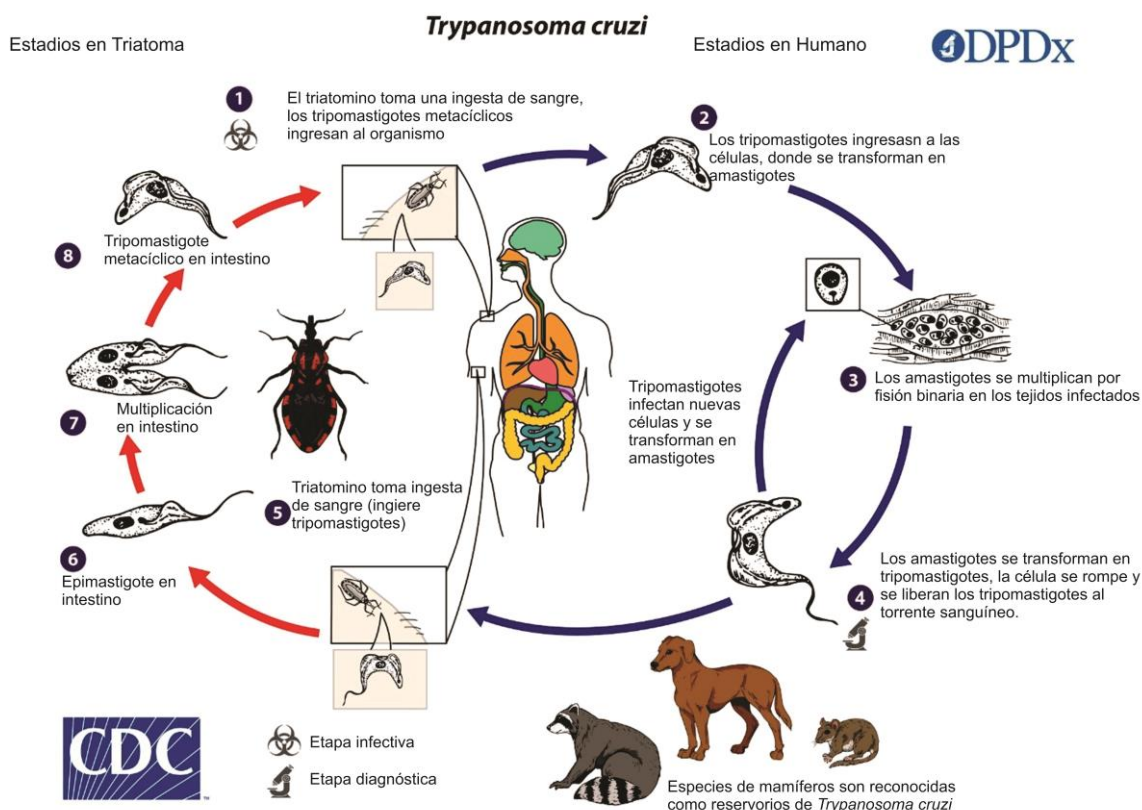


Fig. 2: Ciclo biológico de *Trypanosoma cruzi* (Fuente: CDC). Figura adaptada de https://www.cdc.gov/dpdx/trypanosomiasisamerican/modules/Chagas_LifeCycle_lg.jpg.

1.2.2. Diversidad Biológica

T. cruzi es una especie con una gran variabilidad genética y fenotípica compuesta por poblaciones heterogéneas que se encuentran circulando entre los distintos hospederos. Esta gran diversidad se refleja en su morfología, patrones de infección, grado de virulencia, tropismo tisular, propiedades inmunológicas, susceptibilidad a distintas drogas tripanocidas (en modelos murinos) y su distribución geográfica (Zingales et al. 2009; Zingales et al. 2017).

El estudio y caracterización de las formas sanguíneas de *T. cruzi* aisladas de pacientes y animales infectados dio lugar a su clasificación en cepas diferentes en base a las características mencionadas anteriormente (Revollo et al. 1998; Martínez-Díaz et al. 2001; Buscaglia et al. 2003). Por consenso internacional, en el año 1999, se propuso que la especie *T. cruzi* estuviera constituida por dos grupos filogenéticos principales, determinados por marcadores bioquímicos y moleculares, los que fueron denominados *T. cruzi* I y *T. cruzi* II. Posteriormente la heterogeneidad del segundo grupo permitió que se dividiera en 5 subgrupos denominados *T. cruzi* II a-e (Brisse et al. 2000).

En el año 2009 durante la reunión satélite ("Second Satellite Meeting", Buzios, Brasil), teniendo en cuenta nuevos estudios filogenéticos basados en patrones genéticos, marcadores bioquímicos y moleculares se acordó un consenso para una nueva clasificación de los linajes de *T. cruzi* en 6 unidades discretas de tipificación (UDTs) designadas como TcI (correspondiente al linaje *T. cruzi* I) y TcII a TcVI (correspondientes al linaje *T. cruzi* II) (Zingales et al. 2009).

El comité planteó que no se descarta el surgimiento de nuevas UDTs, tal como es el caso de Tcbat que corresponde a un grupo de aislamientos del parásito en murciélagos que exhibieron una combinación de genotipos distinta a las existentes en las 6 UDTs descriptas (Zingales et al. 2012).

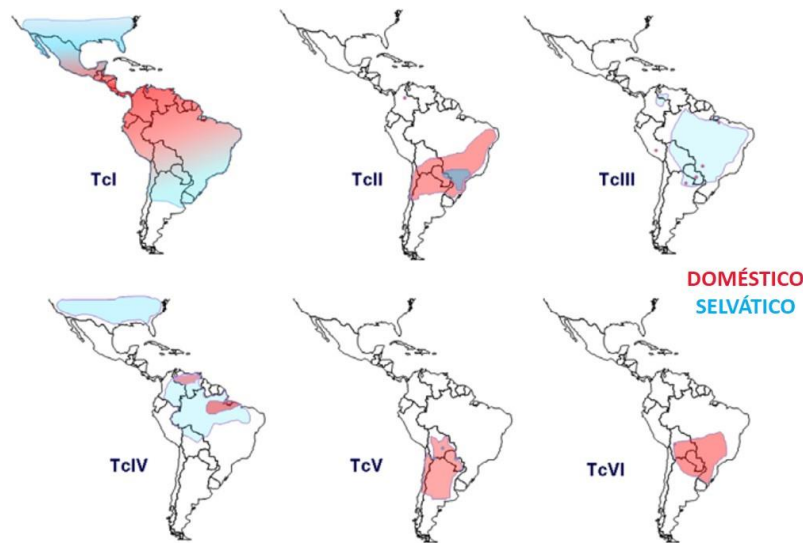


Fig. 3: Distribución geográfica de las UDTs de *Trypanosoma cruzi* y su asociación con los ciclos de transmisión doméstico y selvático. Adaptado de Zingales et al. 2012 (Zingales et al. 2012).

En este trabajo de tesis doctoral se utilizaron dos cepas de *T. cruzi* de dos UDTs distintas. La cepa RA que pertenece a la UDT TcVI y el clon K98 de la cepa CA-I que pertenece a la UDT TcI y de acuerdo a la Iniciativa Genoma de *Trypanosoma cruzi*, son los únicos genotipos aislados, es decir obtenidos a partir de muestras de pacientes, en Argentina (*Trypanosoma cruzi* Genome Initiative, 2000).

Cepa RA: se obtuvo originalmente de un paciente pediátrico que cursaba la fase aguda de la enfermedad (González Cappa et al. 1981). Forma parte de la UDT TcVI. Esta cepa se caracteriza por ser altamente virulenta y letal en el modelo murino cuando se inocula por vía intraperitoneal con 500 o más parásitos en una primoinfección. Es pantrópica y, además, es capaz de inducir anticuerpos líticos en ensayos *in vitro* (Muller et al. 1986; Celentano et al. 1993; Mirkin et al. 1997).

Cepa CA-I, Clon K98: la cepa CA-I fue obtenida originalmente de un paciente adulto con miocardiopatía chagásica crónica (González Cappa et al. 1980). Forma parte de la UDT TcI. El clon K98 fue obtenido a partir de la cepa CA-I por la Dra. Celentano (Celentano et al. 1993). Tanto la cepa como el clon son de baja virulencia. Ambos son miotrópicos e inducen escasos niveles de anticuerpos líticos (Muller et al. 1986; Celentano et al. 1993).

1.3 Epidemiología

La infección por *T. cruzi* es endémica en América Latina, asociada a factores climáticos y socioeconómicos que favorecen, generalmente en áreas rurales, la presencia del insecto vector en el domicilio o peridomicilio (Nunes et al. 2013) (Fig. 4). De acuerdo a las estimaciones realizadas por la Organización Panamericana de la Salud (OPS) y por la Organización Mundial de la Salud (OMS) la enfermedad es endémica en 21 países de América y afecta

aproximadamente a 8 millones de personas, alrededor de entre 25 y 70 millones de personas están en riesgo de contagiarse y existen 30000 casos nuevos anuales por todas las vías de infección

(<https://www.paho.org/es/temas/enfermedad-chagas>, [https://www.who.int/es/news-room/fact-sheets/detail/chagas-disease-\(american-trypanosomiasis\)](https://www.who.int/es/news-room/fact-sheets/detail/chagas-disease-(american-trypanosomiasis)))).

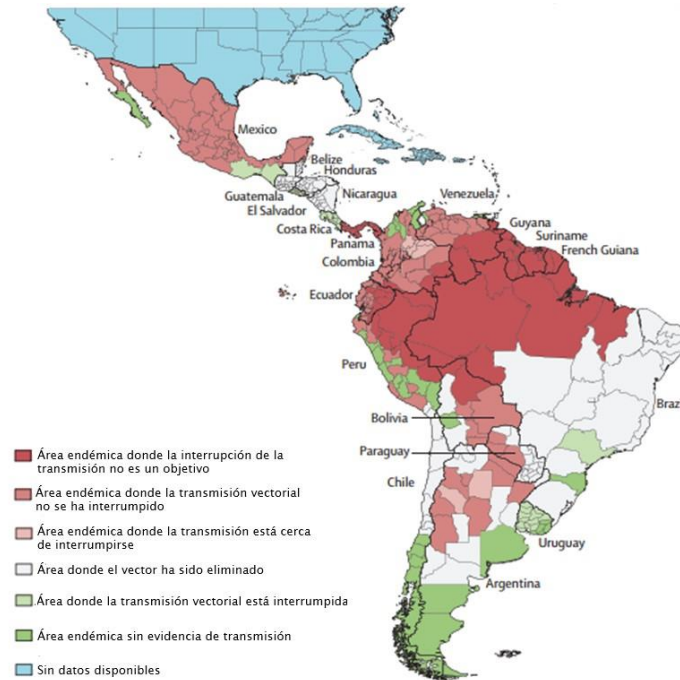


Fig. 4: Mapa epidemiológico de la transmisión vectorial en América (adaptado de Pérez-Molina et al. 2018 (Pérez-Molina et al. 2018)).

Durante muchas décadas la enfermedad de Chagas se encontraba estrictamente en áreas rurales. Sin embargo, debido a cambios en el estilo de vida por el éxodo rural, cambios socio-económicos, deforestación y urbanización se ha transformado el perfil epidemiológico de la infección

(<https://www.who.int/news-room/q-a-detail/chagas-disease>) ([https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/chagas-disease-\(american-trypanosomiasis\)](https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/chagas-disease-(american-trypanosomiasis)))).

Además, debido a las migraciones, la enfermedad de Chagas ha sido llevada hacia zonas no endémicas como América del Norte, algunos países de Europa, Asia y Oceanía. En dichas regiones, en las cuales no hay transmisión vectorial, se ha convertido en una importante temática de salud merced a la transmisión transfusional y congénita (Schmunis et al. 2010; Traina et al. 2016; Antinori et al. 2017; Monge-Maillo et al. 2017).

1.4. Vías de transmisión

Existen distintas vías de transmisión de la infección por *T. cruzi*. La prevalencia e incidencia de cada una, varía de acuerdo a la región geográfica y a los controles que se realizan sobre cada una de ellas.

1.4.1. Vía vectorial

En áreas endémicas, la vía predominante de transmisión tanto a seres humanos como a otros mamíferos es la vectorial.

Los insectos vectores pertenecen a la familia *Reduviidae*, subfamilia *Triatominae*, que posee más de 130 especies, pero solo algunas son vectores de *T. cruzi* y en Argentina se denominan vulgarmente vinchucas (Gourbiere et al. 2012).

Se pueden distinguir tres ciclos de transmisión superpuestos con intervención del vector: el silvestre, el peridoméstico y el doméstico (Cardinal et al. 2008; Gürtler et al. 2015).

El ciclo silvestre comprende la circulación de los parásitos entre los insectos vectores y los reservorios silvestres (generalmente mamíferos de pequeño tamaño como roedores, marsupiales, armadillos, entre otros).

El ciclo peridoméstico comprende a mamíferos (mamíferos de corral, perros, gatos, etc.) y aves de corral que habitan en el peridomicilio y tienen contacto con el ser humano y sus viviendas. Es importante mencionar que estas aves no se infectan debido al efecto refractario mediado por el complemento, pero su sangre es fuente de alimentación de los triatominos.

El ciclo doméstico comprende la infección del ser humano con *T. cruzi* y la consecuente enfermedad de Chagas. Además, en este ciclo se incluye al perro, que mantiene alta parasitemia por periodos de tiempo prolongados lo cual favorece la transmisión de parásitos a las personas.

Estos ciclos no ocurren uno aislado del otro, sino que pueden superponerse con distinta frecuencia de acuerdo a las características epidemiológicas de cada lugar. Por ejemplo, cuando hay una invasión ocasional de vectores en los domicilios.

El control vectorial ha sido el método más útil para controlar y prevenir la enfermedad de Chagas en zonas endémicas, gracias a la implementación de programas nacionales, de la OPS y de la OMS para la interrupción de la vía de transmisión vectorial.

1.4.2. Vía vertical o congénita

Esta vía se refiere a la transmisión de una generación a la siguiente, incluyendo la transmisión prenatal, perinatal y postnatal de parásitos vivos. En este caso el estadio responsable de la infección es el tripomastigote sanguíneo. Invade placenta, se diferencia a amastigote, se multiplica y vuelve a diferenciar a tripomastigote invadiendo la faz fetal de la placenta.

La transmisión congénita de *T. cruzi* puede ocurrir tanto en la fase aguda como en la crónica de la infección materna (Carlier et al. 2012). Sin embargo, por causas epidemiológicas, la amplia mayoría de los casos ocurren cuando las gestantes cursan la fase crónica. Además, puede ocurrir en embarazos subsiguientes y durante todo el periodo fértil de la mujer (Carlier et al. 2012; 2015).

Epidemiológicamente se define la vía de transmisión vertical cuando un neonato nace de una madre infectada y se detectan parásitos al nacimiento o se detectan parásitos o anticuerpos específicos de origen no materno y las vías vectorial y transfusional pueden ser descartadas (Carlier et al. 2015). Aún no existen medios para prevenir este tipo de transmisión, ya que el tratamiento farmacológico de la gestante no se puede implementar por la fetotoxicidad de los fármacos tripanocidas.

1.4.3. Vía transfusional

En la mayoría de los países de Latino América, las transfusiones sanguíneas son seguras, con una cobertura del tamizado de sangre del 99% (Schmunis et al. 2005). Sin embargo, debido a las migraciones hacia países no endémicos se ha convertido en un problema de salud en estos países, donde es necesario aplicar un correcto tamizado de la sangre (Angheben et al. 2015). El riesgo de contraer la enfermedad por esta vía representa un 10-20% de los casos y depende de varios factores como la concentración de parásitos en sangre (Angheben et al. 2015) o tejidos (Kransdorf et al. 2014) del donante y la cepa del parásito.

1.4.4. Transmisión por trasplante de órganos

En áreas endémicas es obligatorio el control serológico del donante y el receptor, para evitar casos de transmisión. En este caso, se presenta una problemática particular debido a la inmunosupresión post-trasplante del receptor si ocurre una transmisión vía trasplante de órgano (Kransdorf et al. 2014). Debido a esto, los pacientes trasplantados deben ser monitoreados. En caso de que los pacientes desarrollen síntomas como presencia de parásitos en sangre (entre otros signos que se pueden presentar) se indica el tratamiento parasiticida. El estadio responsable de la transmisión es el amastigote.

1.4.5. Vía oral

En los últimos años se han reportado numerosos brotes de infección aguda por *T. cruzi* causados por la ingestión de tripomastigotes metacíclicos presentes en el jugo de caña o del fruto de açai (*Euterpe oleracea*) u otros frutos de la región de Amazonia. La presencia de los parásitos puede deberse a que la bebida se encuentre contaminada con heces de los triatominos o incluso que durante la preparación de la misma se hayan incorporado insectos (Foligheddu et al. 2017). La infección por vía oral está asociada a síntomas severos como fiebre prolongada, miocarditis aguda, falla cardíaca y la mortalidad puede llegar a alcanzar al 33% de los infectados (Shikanai-Yasuda et al. 2012).

1.5. Curso clínico de la enfermedad: Fases de la infección

La enfermedad de Chagas es compleja, involucra diversos factores tanto del parásito como del hospedador, siendo relevantes en este último, el estado de sistema inmune y los procesos inflamatorios que se desarrollan como consecuencia de la respuesta a *T. cruzi* (Machado et al. 2012b; Pérez-Molina et al. 2018).

Clínicamente la enfermedad de Chagas tiene dos fases: aguda y crónica, la última de las cuales puede ser asintomática o sintomática, en algunos casos, luego de varios años de infección.

La fase aguda dura aproximadamente 8 semanas. En esta etapa ocurren ciclos asincrónicos de multiplicación de los parásitos dentro de las células hospedadoras que luego se lisan y liberan a los tripomastigotes que tienen la capacidad de infectar nuevas células (Bern et al. 2011; Bonney et al. 2019). Los individuos infectados pueden cursar esta fase de forma asintomática o con sintomatología leve y no específica (fiebre, adenopatías, náuseas) lo que hace que frecuentemente se confunda con alguna infección viral excepto que se presente un signo claro de la infección como inflamación en el sitio de la picadura del insecto (Chagoma de inoculación o signo de Romaña) (Rassi et al. 2010; Echeverría et al. 2019). En el 10% de los casos, se

desarrolla una fase aguda severa, con síntomas como miocarditis, esplenomegalia, meningoencefalitis, presentando una tasa de mortalidad del 0,25% al 0,50%, causada principalmente por complicaciones a nivel cardíaco (Bern et al. 2011).

En la mayoría de los individuos infectados el sistema inmune logra controlar la parasitemia y resolver espontáneamente las manifestaciones, aunque el parásito no es erradicado. Este periodo se denomina fase crónica asintomática, la cual se caracteriza por presentar una parasitemia baja y por la detección de anticuerpos IgG anti-antígenos de *T. cruzi*, sin signos evidentes de enfermedad. Sin embargo, alrededor del 30% de los casos deriva en una fase crónica sintomática con manifestaciones clínicas, aproximadamente a partir de los 10- 20 años de la primoinfección, siendo las principales la miocardiopatía y los megasíndromes digestivos, que pueden ocurrir separadamente o en simultáneo en un mismo paciente (Rassi et al. 2010; Pérez-Molina et al. 2018). El corazón es el órgano más frecuentemente afectado. Los pacientes con enfermedad crónica presentan estudios ecocardiográficos y electrocardiográficos anómalos, característicos de una miocarditis lenta y progresiva que deriva en dilatación ventricular e insuficiencia cardíaca crónica (Bocchi et al. 2017; Echeverría et al. 2019). Las manifestaciones clínicas de la patología son diversas, posiblemente debido a los distintos mecanismos patogénicos que ocurren (Bona et al. 2018).

1.6. Cardiomiopatía Chagásica Crónica

La Cardiomiopatía Chagásica Crónica (CCC) es una forma de cardiopatía dilatada en la cual se presentan manifestaciones tempranas diversas como infiltrados inflamatorios focales o difusos con predominio de células mononucleares, fibrosis progresiva, anomalías en el sistema de conducción y alteraciones en la motilidad del ventrículo izquierdo. Las manifestaciones clínicas tardías incluyen el desarrollo de arritmias auriculares y ventriculares, disfunción ventricular izquierda, miocardiopatía dilatada e insuficiencia cardíaca congestiva (Rassi et al. 2010; Bonney et al. 2019).

La infección por *T. cruzi* provoca la síntesis de gran cantidad y diversidad de citoquinas, quemoquinas y enzimas pro-inflamatorias, incluyendo la enzima óxido nítrico sintasa 2 o NOS2 (Nitric Oxide Synthase 2, por sus siglas en inglés) y metaloproteasas lo cual resulta en procesos de inflamación y remodelación cardíaca. Esto ha sido observado tanto en estudios en modelos experimentales como en estudios en humanos (Araújo et al. 2011; Penas et al. 2013; Acevedo et al. 2018).

Diversos factores asociados al daño tisular, debido a la persistencia parasitaria, la inflamación y la fibrosis contribuyen al desarrollo de la CCC (Tanowitz et al. 2015). La remodelación de la matriz extracelular y la fibrosis provocan un aumento de la rigidez del miocardio. Además, se presentan otros cambios morfológicos e histológicos en los corazones de los pacientes con CCC, como adelgazamiento de las paredes ventriculares y trombos apicales. A su vez, hay una destrucción generalizada de las células cardíacas, fibrosis difusa moderada o intensa e infiltrado inflamatorio con predominio de células mononucleares (Marín-Neto et al. 2007; Tanowitz et al. 2015; Bonney et al. 2019).

Los cambios estructurales y funcionales que sufre el corazón son de carácter irreversible, pudiendo conducir a la muerte del paciente (Machado et al. 2012a).

Diversos modelos experimentales han sido propuestos para reproducir las características de la patología de la enfermedad de Chagas humana. En modelos caninos se han observado

alteraciones electrocardiográficas o alteraciones de la función sistólica o diastólica (Andrade et al. 1987; Cruz et al. 2016; Vitt et al. 2016). En cuanto a los modelos murinos se ha observado que solo algunas cepas de ratón infectadas con determinadas cepas de *T. cruzi* son susceptibles al desarrollo de alguna patología cardíaca. En estos estudios se reportan cambios histológicos (Eickhoff et al. 2010), alteraciones ecocardiográficas y electrocardiográficas (Vilar-Pereira et al. 2016).

La fase crónica de la enfermedad de Chagas representa, en parte, una reacción lenta, progresiva y cíclica debido a la presencia de parásitos lo cual resulta finalmente en una reacción inflamatoria continua, a lo largo del tiempo. En varios casos de personas en fase crónica, se ha demostrado por estudios de PCR e inmunohistoquímica la presencia de un bajo número de parásitos, fragmentos o antígenos parasitarios que serían estímulos para la inflamación persistente en los tejidos (Guedes et al. 2012; Rassi et al. 2007). Diferentes estudios en humanos y en modelos animales apoyan esta idea, dado que indican que el tratamiento tripanocida no elimina completamente los parásitos, lo cual apoyaría la hipótesis de que subsisten estímulos que contribuyen a la reacción inflamatoria (Bonney et al. 2019). Sin embargo, la inflamación y la presencia de *T. cruzi* suelen no tener correlación temporal, lo cual sugiere que hay otros mecanismos que contribuyen a la respuesta inflamatoria exacerbada y persistente. Cabe destacar que, aunque no se observen parásitos, esto no significa que no persistan por algún tiempo antígenos parasitarios. Por ejemplo, Lewis et al. (Lewis et al. 2014) utilizando parásitos luminiscentes demostraron que hay desarrollo de miocarditis en completa ausencia de parasitismo cardíaco.

En este sentido, *T. cruzi* presenta diversos mecanismos de evasión de la inmunidad, desde la alternancia entre formas intracelular y extracelular, a mecanismos de alteración de la respuesta del sistema de complemento y efectos sobre macrófagos, linfocitos T y linfocitos B (Nardy et al. 2015; Cardillo et al. 2015; Acevedo et al. 2018).

En segundo lugar, los procesos inflamatorios son necesarios para proporcionar un adecuado microambiente para controlar la infección. Sin embargo, la inflamación sostenida en el tiempo y exacerbada, es perjudicial para el tejido cardíaco (Rassi et al. 2010; Pérez-Molina et al. 2018; Bonney et al. 2019).

1.7. Tratamiento etiológico

Actualmente los tratamientos tripanocidas se basan en:

- Nifurtimox ((RS)-N-(3-metil-1,1-dioxo-1,4-tiazinan-4-il)-1-(5-nitro-2-furil) metanimina). Sintetizado en 1952.
 - Benznidazol (2-nitroimidazol N-bencil-2-(2-nitroimidazol-1-il) acetamida). Sintetizado en 1968.
- Ambas drogas son efectivas para reducir la carga parasitaria en la etapa aguda de la enfermedad, en la transmisión congénita y en niños, sin embargo, estudios clínicos han demostrado que son ineficaces para promover la mejoría clínica en adultos que transitan la fase crónica de la infección.

En los últimos años se han llevado a cabo ensayos clínicos sobre la eficacia de benznidazol en el tratamiento de pacientes con cardiomiopatía crónica. BENEFIT (prospectivo, multicéntrico y aleatorizado) y TRAENA (aleatorizado, doble ciego, fase III) son dos de los ensayos clínicos con mayor relevancia. En el ensayo BENEFIT se determinó que el tratamiento reduce ampliamente la detección de parásitos en sangre, pero no logró mejorar significativamente el deterioro

cardíaco de los pacientes (Morillo et al. 2015; Sociedad Argentina de Protozoología 2016; Pérez-Molina et al. 2018).

Benznidazol es generalmente preferido al Nifurtimox probablemente porque tiene un mejor perfil de tolerancia, mayor penetración en los tejidos y probablemente mayor eficacia (Pérez-Molina et al. 2018). Si bien se han descripto probables mecanismos de acción de esta droga en ensayos *in vitro* como los realizados por Specker et al. (Specker et al. 2022), dicho mecanismo no se ha podido explicar en su totalidad (Maya et al. 2007, Specker et al. 2022).

2. Inmunidad frente a la infección por *Trypanosoma cruzi*

La evolución de la compleja interacción parásito-hospedadores es un proceso dinámico que implica la activación de los mecanismos inmunes del hospedador para evitar la infección, y cambios en el parásito para evadir la respuesta inmune (Iwasaki et al. 2015).

2.1. Características generales de la respuesta inmune

El sistema inmune está constituido por diversos componentes que contribuyen a dos tipos de respuesta, la innata y la adaptativa, con un alto grado de coordinación y dinamismo entre ellas. A su vez, cada una posee características propias (Chaplin 2010).

Ante una infección, los diversos componentes del sistema inmune innato, tanto celulares como humorales se activan rápidamente creando la primera línea de defensa para eliminar al patógeno. Sin embargo, en aquellos casos en los que no logran eliminar al microorganismo se genera la respuesta adaptativa, que aunque demorada en su desarrollo posee mayor eficacia y alta especificidad, lo cual le permite generar memoria inmune en caso de posibles reinfecciones (Hillion et al. 2020).

2.1.1. Comportamiento de la respuesta inmune frente a la infección con *T. cruzi* en las fases aguda y crónica asintomática: características generales

La relación entre *T. cruzi* y sus hospedadores mamíferos ha ejercido una presión evolutiva en favor de una infección crónica (Nardy et al. 2015). En este sentido, se ha demostrado que *T. cruzi* es capaz de permanecer en algunos tejidos y multiplicarse intracelularmente (Chevallard et al. 2018; Bonney et al. 2019).

El sistema inmune innato posee varias propiedades entre ellas, determinar y regular el perfil de la respuesta inmune adaptativa; además, en el caso de la infección por *T. cruzi* contribuye al control de la multiplicación del parásito y su diseminación a distintos órganos blanco.

La interacción entre ligandos del parásito y los receptores celulares resulta en la activación de diferentes vías de señalización intracelular que disparan la producción de citoquinas y enzimas de la respuesta inmune que pueden tener roles duales dependiendo en que fase de la infección se expresen, lo cual define el tipo de respuesta predominante en cada una de dichas fases (Echeverría et al. 2019; Cerbán et al. 2020). Entre los mediadores pro-inflamatorios, podemos mencionar el factor de necrosis tumoral alfa (TNF α), la interleuquina 6 (IL-6) y la

enzima óxido nítrico sintasa inducible (iNOS o NOS2) cuyo metabolito, el óxido nítrico (NO) es de gran importancia para la eliminación del parásito, debido a su capacidad parasiticida (Teixeira et al. 2002; Gutierrez et al. 2009b; Maldonado et al. 2021). Asimismo, se promueve la síntesis de mediadores anti-inflamatorios como interleuquina 10 (IL-10) y el factor de crecimiento transformante beta (TGFβ) (Machado et al. 2012a; Cardillo et al. 2015). Más aún, distintas poblaciones celulares como macrófagos, linfocitos, células dendríticas y monocitos infiltran en el tejido infectado donde cumplirán funciones diversas como la producción de mediadores inmunológicos, amplificación de las cascadas de señalización intracelular, etc (Acevedo et al. 2018; Bonney et al. 2019).

La intensa respuesta inflamatoria, tanto tisular como sistémica, que se desarrolla en la fase aguda y en los primeros estadios de la fase crónica asintomática, resulta beneficiosa para el hospedero ya que promueve el control del parásito (Cardillo et al. 2015; Acevedo et al. 2018).

Durante las primeras etapas de la infección se establece un perfil celular Th1/Th17 de características pro-inflamatorias. Luego, a medida que la parasitemia decae, las características del perfil celular cambian a uno de tipo reparador y/o regulador Th2/Treg. Los mediadores que se producen cuando predomina el perfil reparador, colaboran para finalizar la respuesta inflamatoria y se encuentran en un balance con los mediadores pro-inflamatorios, para evitar la reactivación de la infección (Dutra et al. 2014; Cardillo et al. 2015; Bestetti et al. 2018).

Durante la fase crónica asintomática hay un equilibrio entre la producción de mediadores pro-inflamatorios y anti-inflamatorios en el que se observan mecanismos inmunorreguladores, como la participación de IL-10 y células T reguladoras (Treg), que limitan la respuesta inmune pro-inflamatoria, evitando por un lado que *T. cruzi* se multiplique y, por otro, que los componentes inflamatorios dañen al tejido a causa de la respuesta inflamatoria exacerbada (Araújo et al. 2012; Cerbán et al. 2020; Bonney et al. 2019).

A pesar de que en la fase crónica asintomática se observan niveles bajos de parasitemia, la persistencia del patógeno juega un papel crucial en el desarrollo del desbalance que conlleva a una reacción inflamatoria exacerbada que provoca anomalías y remodelación cardíaca, lo cual desencadena la fase crónica sintomática (Sanmarco et al. 2018; Wesley et al. 2019).

2.1.2. Inmunidad frente a la infección por Trypanosoma cruzi en la etapa crónica sintomática de la infección

En el contexto de una infección, y como resultado del inicio de la respuesta inmune, los linfocitos T CD4⁺, luego de ser activados, pueden producir una o múltiples citoquinas simultáneamente (células monofuncionales o polifuncionales, respectivamente) (Albareda et al. 2015), y cumplen un rol fundamental en la regulación de la inflamación controlando un posible daño tisular (Pérez-Molina et al. 2018) y en la infección por *T. cruzi*, estas células adquieren diferentes perfiles de activación de acuerdo al microambiente generado en cada una de las distintas etapas (Acevedo et al. 2018; Bonney et al. 2019).

En la etapa crónica sintomática de la infección se observa un intenso infiltrado inflamatorio compuesto principalmente por monocitos y linfocitos T CD8⁺ y T CD4⁺ que expresan altos niveles de mediadores pro-inflamatorios como TNFα, INFγ, IL-17, TGFβ e IL-6, especialmente donde se observan antígenos de *T. cruzi* (Sanoja et al. 2013), que en un principio generan una

respuesta beneficiosa para el hospedador durante la fase aguda, como se ilustra en la Figura 5. Sin embargo, la expresión y producción excesiva de dichos mediadores a lo largo de la infección conllevaría a una respuesta inflamatoria exacerbada que contribuye al deterioro del tejido y el consecuente desarrollo de patologías cardíacas (Bocchi et al. 2017; Cerbán et al. 2020). Estudios en pacientes y experimentales revelaron que estas citoquinas se encuentran más elevadas en pacientes que cursan la fase crónica de la miocardiopatía chagásica que en pacientes asintomáticos (Araújo et al. 2011; Bestetti et al. 2018). Además, una característica de la miocardiopatía crónica es la presencia de fibrosis cardíaca, que tiene correspondencia con altas concentraciones de TGF β y metaloproteasas de la matriz extracelular como la MMP9 (Machado et al. 2012a; Trachtenberg et al. 2017).

La enzima NOS2 también se encuentra elevada y, en consecuencia, hay una producción desmedida de su producto NO, lo cual es perjudicial para el tejido cardíaco (Teixeira et al. 2002; Santos-Miranda et al. 2020).

En la enfermedad de Chagas se ha descrito que pacientes muestran una alta frecuencia de células T activadas que secretan citoquinas pro- y anti-inflamatorias (Cardillo et al. 2015). La respuesta T es importante para mantener la parasitemia baja, sobre todo en la etapa crónica de la enfermedad, pero si esta respuesta es afectada o dañada (por ejemplo, coinfección con HIV) conlleva a la interrupción del control de la parasitemia y al inicio de distintas manifestaciones clínicas (Pérez-Molina et al. 2018; Acevedo et al. 2018).

Como se ha mencionado previamente si el balance inmunorregulador se rompe, evoluciona hacia la etapa crónica sintomática, en la que predomina un perfil inflamatorio de tipo Th1/Th17 y bajos o nulos niveles de perfil regulador de tipo Th2/Treg como se ilustra en la Figura 5 (Sanoja et al. 2013; Bestetti et al. 2018).

Cabe destacar que los mecanismos de evasión de *T. cruzi* influyen en los desequilibrios que se observan a lo largo de la infección y que le permiten al parásito permanecer en el organismo (Nardy et al. 2015; Cardoso et al. 2016).

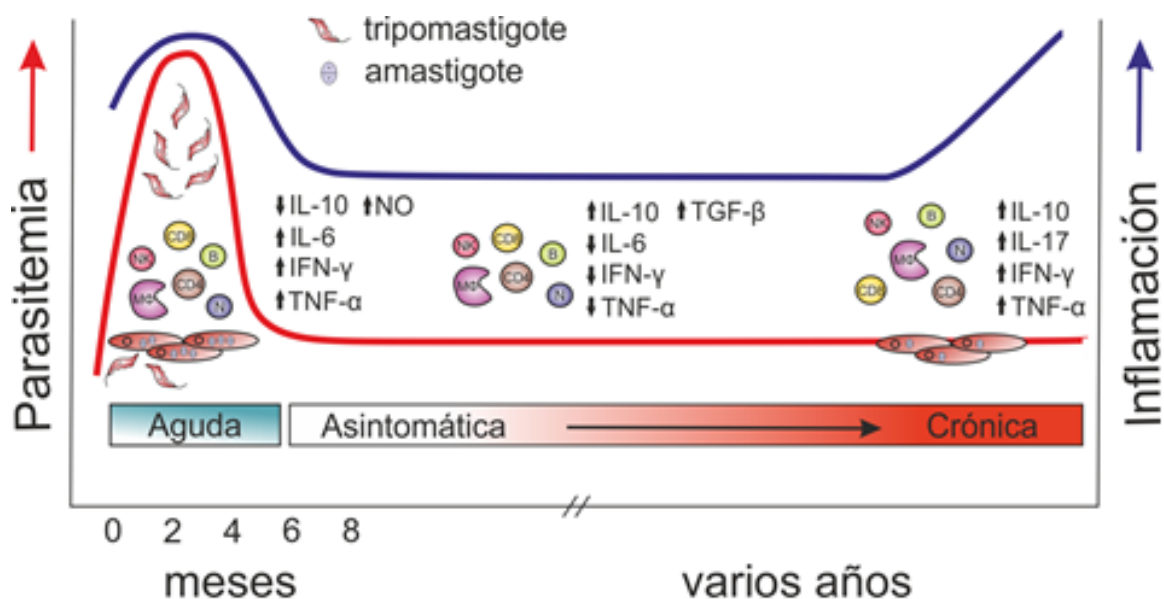


Fig. 5: Componentes de la respuesta inmune frente a la infección por *T. cruzi* en el transcurso de la infección (Figura adaptada de Machado et al. 2012b).

A continuación, se detallarán las funciones principales de las células y citoquinas durante la infección por *T. cruzi* en el tejido cardíaco en la etapa crónica sintomática.

2.1.3. Macrófagos

Los macrófagos son células diferenciadas a partir de monocitos y son células presentadoras de antígenos (CPA), altamente especializadas, que cumplen importantes funciones efectoras y reguladoras tanto en la inmunidad innata como en la inmunidad adaptativa (Machado et al. 2012b).

Son células con una alta plasticidad fenotípica que, históricamente, se clasifican como macrófagos inflamatorios o “activados clásicamente” (M1) y macrófagos reguladores o “activados alternativamente (M2). Sin embargo, en los últimos años, se han reportados distintas poblaciones de macrófagos que se encuentran en determinados tejidos y con un alto grado de especialización para responder de acuerdo con los estímulos recibidos y al tejido donde estén presentes.

Particularmente en la infección por *T. cruzi* los macrófagos M1 se generan en respuesta a la estimulación de mediadores como IFN γ y TNF α durante la activación de la respuesta inmune. Este perfil se caracteriza por tener una alta actividad microbicida/tumorocida, producción de citoquinas pro-inflamatorias (IL-1 β , IL-6, TNF α) metabolitos pro-inflamatorios (especies reactivas de oxígeno (ROS)) y quimiocinas (Murray et al. 2014). El perfil M2 se genera por la presencia en el ambiente de IL-4, IL-10, IL-13, TGF β , complejos inmunes o glucocorticoides. El fenotipo M2 posee la capacidad de producir IL-10 lo cual es relevante durante la fase de la resolución de la inflamación (Lawrence et al. 2011; Penas et al. 2013; Shapouri-Moghaddam et al. 2018). Fizz, Ym1 y CD206 son tres marcadores que caracterizan al perfil M2. Fizz posee propiedades quimiotácticas; Ym1 tiene afinidad por glicosaminoglicanos como la heparina y CD206 (también denominado Receptor de Manosa), es una proteína de transmembrana que internaliza ligandos de glicoproteínas (Roszer 2015).

En el contexto de la infección por *T. cruzi*, el corazón es uno de los órganos blanco y es parasitado en niveles muy elevados. Durante la fase aguda, con el fin de controlar la multiplicación del parásito, los monocitos migran desde la sangre periférica hacia el sitio de infección. Una vez allí, se diferencian a macrófagos M1 ejerciendo funciones microbicidas y, junto a otras células, participan en el control de la infección. La activación de macrófagos desencadena la producción de citoquinas como TNF α e IL-12, y otros mediadores pro-inflamatorios como óxido nítrico (NO) para amplificar la respuesta y atraer más células al foco infeccioso (Chowdhury et al. 2017).

En este sentido los macrófagos que previamente habían sido los principales actores en el proceso inflamatorio pueden posteriormente participar de la resolución de dicho proceso mediante la producción de citoquinas anti-inflamatorias, factores pro-angiogénicos y factores de crecimiento (Lawrence et al. 2011; Shapouri-Moghaddam et al. 2018).

2.1.4. Mediadores inflamatorios y pro-fibróticos

Ante la presencia de un patógeno, diferentes poblaciones celulares producen mediadores con capacidad de modular diversos eventos inmunológicos y sus efectos pueden ser autocrinos, paracrinos o endócrinos (Medzhitov 2007).

Entre los distintos mediadores pro-inflamatorios, las citoquinas cumplen un rol fundamental en la inducción y modulación de la respuesta inflamatoria. Son polipéptidos producidos por diversos tipos celulares que ejercen su función mediante la interacción con receptores de membrana induciendo distintas vías de señalización intracelular. Los efectos ejercidos por las citoquinas son pleiotrópicos y redundantes (Dinarello 2007; Spangler et al. 2015; Liu et al. 2021). El perfil de citoquinas depende, entre otros factores, del estado de diferenciación de las células, del microambiente en donde se encuentran, del agente infeccioso y de la etapa de la enfermedad (Mosmann et al. 2009; Galdiero et al. 2018; Mantovani et al. 2019; Macaluso et al. 2023).

TNF α : es una de las citoquinas más estudiadas en la fisiopatología cardíaca ya que posee efectos directos sobre la contractilidad de los miocardiocitos y se ha demostrado que altera la homeostasis del calcio (Ca^{2+}) (Janczewski 2010; Varfolomeev et al. 2018). Particularmente en la enfermedad de Chagas esta citoquina incrementa el reclutamiento y maduración de los macrófagos y células polimorfonucleares (Andrade et al. 2014; Cardillo et al. 2015). Es capaz de promover el aumento intracelular de especies reactivas del nitrógeno (ERN), para controlar al parásito. Sin embargo, esta activación sostenida podría provocar alteraciones en la función cardíaca (Nunes et al. 2021).

IL-6: posee propiedades similares a TNF α . Es un mediador soluble, con efectos pleiotrópicos en la inflamación, en la respuesta inmune y en la hematopoyesis (Tanaka et al. 2014). Promueve la diferenciación de células T CD4⁺ *naïve* a diferentes perfiles como Th17 (Korn et al. 2009) o Treg (Bestetti et al. 2018). Al igual que TNF α , si los efectos de IL-6 o la citoquina misma tienen una activación sostenida en el tiempo, son deletéreos para el tejido cardíaco.

Tanto TNF α como IL-6 participan en la inducción de la respuesta inflamatoria aguda, local y sistémica con el fin de eliminar al tripanosoma (Bonney et al. 2019).

Además de las citoquinas pro-inflamatorias, durante la inflamación actúan enzimas que generan metabolitos con potencial citotóxico como la Óxido Nítrico Sintasa 2 o inducible.

NOS2: Esta enzima, es una de las 3 isoformas de la Óxido Nítrico Sintasa (NOS) y es inducible de acuerdo al estímulo. Las isoformas NOS1 y NOS3 se expresan constitutivamente y sintetizan bajas concentraciones de NO. La NOS2 o iNOS es regulada a nivel transcripcional (Pautz et al. 2010) y es capaz de producir altos niveles de NO en respuesta a distintas citoquinas, TNF α por ejemplo, o estímulos patogénicos como la presencia de *T. cruzi* (Pautz et al. 2010). En este contexto de infección la liberación de NO es fundamental para controlar la proliferación del parásito, pero también posee efectos perjudiciales si su síntesis es sostenida en el tiempo ya que contribuye con la patogénesis de la miocardiopatía chagásica crónica (Hovsepian et al. 2011).

A lo largo del proceso inflamatorio se produce la de reparación del tejido, que se evidencia por los depósitos de colágeno que derivan en fibrosis (Deb et al. 2014). Existen dos tipos de fibrosis: de reemplazo y reactiva. La primera ocurre cuando células cardíacas son reemplazadas por colágeno (Ribeiro et al. 2012). Si la fibrosis ocurre por depósitos de fibras de colágeno entre los miocardiocitos se denomina fibrosis reactiva (Machado et al. 2012a). Ambos tipos de fibrosis pueden causar disfunción cardíaca. En la fibrosis participan moléculas de distinta naturaleza, como citoquinas, enzimas, factores de crecimiento entre otros. A continuación, se describen dos mediadores estudiados en este trabajo de tesis: TGF β y Metaloproteasas de la matriz extracelular (MMP).

TGF β : es un mediador con funciones dependientes del contexto como, por ejemplo, homeostasis o un proceso inflamatorio, por lo cual tiene la capacidad de estimular o inhibir la proliferación de células de acuerdo al microambiente en el que se encuentra (Morikawa et al. 2016). Además, es una de las citoquinas involucradas en la diferenciación de perfiles Th17/Treg (Ivanov et al. 2006; Ferragut 2021). Ha sido reportado que TGF β puede ser inducido como promotor del proceso de fibrosis en el corazón en la enfermedad de Chagas, contribuyendo a la reparación del tejido (Ferreira et al. 2022) y participa en la diferenciación celular a miofibroblastos (Araújo-Jorge et al. 2012).

Metaloproteasas (MMPs): son una familia de endopeptidasas dependientes de calcio, responsables de la remodelación tisular y degradación de proteínas de la matriz extracelular en procesos fisiológicos como la angiogénesis, embriogénesis, etc (Roy et al. 2008). La sobreexpresión y desregulación de estas endopeptidasas están asociadas a diferentes patologías como artritis (Yamamoto et al. 2021), cáncer (Gobin et al. 2019), enfermedad de Chagas (Baron et al. 2022) entre otras.

La función de la metaloproteasa 9 (MMP-9) es regulada por diversos mecanismos de transcripción génica, secreción, activación y glicosilación (Roy et al. 2006; Wilson et al. 2019). En la cardiopatía inducida por la infección por *T. cruzi*, MMP-9 juega un rol controvertido. Por un lado, contribuiría con la remodelación de la matriz extracelular, favoreciendo la infiltración de células inmunes colaborando con la respuesta inmune. Por otro lado, favorecería que los tripomastigotes infectivos penetren en tejidos, promoviendo su diseminación y contribuyendo al desarrollo de la patología (Penas et al. 2013; Fares et al. 2013). Mientras que en hepatocitos infectados *in vitro* con *T. cruzi* se evidenció la disminución de la expresión de MMP-9 (Nogueira De Melo 2004), en cultivos primarios de miocardiocitos aumenta su expresión (Hovsepian et al. 2011) así como también en tejido cardíaco de ratones infectados (Gutierrez et al. 2009a).

2.1.5. Linfocitos

De modo similar a lo que ocurre con diversos agentes infecciosos, la respuesta inmune adaptativa frente a *T. cruzi* se inicia con la activación y proliferación de linfocitos B y T, que a su vez se diferencian en poblaciones celulares más especializadas (Fresno et al. 2018; Cerbán et al. 2020).

Ambas poblaciones linfocitarias poseen receptores altamente específicos. Al activarse y proliferar tienen la capacidad de proteger más rápida y efectivamente al hospedero frente a

repetidas infecciones con un mismo patógeno mediante la generación de la memoria celular (Fresno et al. 2018).

Particularmente, durante la infección por *T. cruzi* se producen altas concentraciones de IL-12 e IFN γ que promueven la diferenciación de células T hacia un perfil Th1. Estas células se caracterizan por la producción de IFN γ , TNF α e IL-2 y cuyo programa transcripcional característico está determinado por la expresión del factor de transcripción maestro T-bet (Chevallard et al. 2018; Ferragut 2021). En este contexto de infección, esta subpoblación es capaz de controlar al parásito, de promover el reclutamiento y activación de macrófagos y neutrófilos, de modular la diferenciación de células B a células plasmáticas, y la diferenciación de células T a células T citotóxicas, organizando así una respuesta específica contra *T. cruzi*, para poder eliminarlo del organismo, a la vez que genera memoria frente a posibles reinfecciones (Fresno et al. 2018; Chevallard et al. 2018).

Para evitar la posible desregulación de la respuesta Th1, existen mecanismos de regulación de los cuales algunos son llevados a cabo por el fenotipo Th2. Este es inducido por la presencia de IL-4. A su vez, esta población secreta IL-4 y su programa transcripcional está establecido por el factor de transcripción maestro GATA-3 (Bestetti et al. 2018). El perfil Th2 es de tipo reparador o modulador frente a la respuesta inflamatoria provocada por la infección con *T. cruzi* (Acevedo et al. 2018).

Diversos reportes, en estudios de infección por *T. cruzi* en modelos murinos, sugieren que un perfil deseable es aquel donde existe un balance entre Th1 y Th2, con predominancia de Th1 para el control del parásito (Fresno et al. 2018). Esto es lo que ocurre durante la transición de la etapa aguda hacia la etapa crónica asintomática de la enfermedad de Chagas.

Cabe destacar que además de los perfiles Th1 y Th2, existen otros perfiles de linfocitos cooperadores que intervienen a lo largo de la infección, entre ellos Th17 y Treg.

2.2. Balance Treg/Th17

Tanto en condiciones homeostáticas como en las distintas fases de la infección por *T. cruzi* se encuentran presentes dos poblaciones con roles particulares: Th17 y Treg. La diferenciación hacia uno u otro perfil depende de varios factores como el metabolismo y cuales son las citoquinas presentes en el microambiente y el metabolismo celular, y de acuerdo a cuáles predominen se dirigirá la diferenciación hacia uno u otro tipo celular (Weaver et al. 2009; Sun et al. 2017).

A pesar de las diferencias funcionales entre las células Th17 y Treg, ambas poblaciones necesitan la presencia de TGF β en el microambiente para diferenciarse a partir de linfocitos T naïve. Si en el microambiente además de TGF β está presente IL-2, se induce la diferenciación hacia Treg cuyo factor de transcripción característico es FOXP3. Esta población celular participa en el mantenimiento de la homeostasis, en la regulación de la inflamación, así como otras funciones. En cambio, si en el microambiente están presentes TGF β e IL-6, se promueve el desarrollo del linaje Th17, cuyo factor de transcripción maestro es ROR γ t. Estas células cumplen un rol protector frente a patógenos, pero también promueven efectos colaterales contribuyendo al proceso inflamatorio exacerbado (Sehrawat et al. 2017).

Durante la etapa aguda de la infección por *T. cruzi* la señalización por Th17 es crucial para reclutar neutrófilos que modulen la actividad de citoquinas pro-inflamatorias como IFN γ ,

limitando el daño tisular mediado por el parásito, al activar macrófagos que aumentan su capacidad microbicida, junto al IFN γ (Mills 2023). Por otro lado, células Treg cumplen un rol fundamental al modular la intensidad del proceso inflamatorio (Cerbán et al. 2020).

A medida que transcurre la infección, el balance Treg/Th17 se va modificando en favor de uno u otro fenotipo. Durante la etapa crónica asintomática el balance favorece a la población de células Treg, dado que hay un control de la respuesta inflamatoria como parte del mecanismo inmunorregulador (Sehrawat et al. 2017). Dentro de estos mecanismos inmunorreguladores las citoquinas anti-inflamatorias juegan un rol fundamental; entre ellas IL-10 que es una de las principales citoquinas anti-inflamatorias del organismo (Saraiva et al. 2010; Rutz et al. 2016; Ouyang et al. 2019). Por otro lado, el perfil Th17 produce IL-17 y otras citoquinas como IL-23, que contribuyen al estado inflamatorio, pero que son controladas por los ya mencionados mecanismos inmunorreguladores (Miossec et al. 2012; Dutra et al. 2014; Cerbán et al. 2020).

En la etapa crónica sintomática de la enfermedad de Chagas el equilibrio entre Treg/Th17 se vuelve inestable y predomina el perfil Th17, dado que aumenta la producción de IL-6 y TGF β que contribuirán a la diferenciación de los linfocitos hacia este perfil de tipo inflamatorio, a la vez que el aumento de la expresión de IL-6 inhibe el desarrollo de Treg (Bestetti et al. 2018).

Todo esto contribuye a la exacerbación del proceso inflamatorio, el cual no podrá ser controlado por los mecanismos inmunorreguladores que, por razones aún desconocidas, no logran revertir el desbalance de la respuesta inmune (Araújo et al. 2012).

Como se ha mencionado en párrafos anteriores, IL-10 es una importante citoquina anti-inflamatoria, que desempeña un rol fundamental al controlar la inflamación durante la enfermedad de Chagas. En el siguiente apartado se describirán sus principales características y su rol en las fases de la infección por *T. cruzi*.

2.3. Interleuquina 10 y su papel en la respuesta inmune frente a *Trypanosoma cruzi*

Interleuquina 10 (IL-10) es una citoquina con funciones pleiotrópicas en el sistema inmune y es secretada por diversos tipos celulares como macrófagos, células T y B, miocardiocitos, fibroblastos, etc (Mosser 2008; Ouyang et al. 2011; Rutz et al. 2016; Saraiva et al. 2020). Su expresión está regulada para evitar patologías asociadas a su deficiencia o exceso. El receptor de IL-10 recibe la señal y es procesada por vías de señalización de JAK kinasas y por activadores de la transcripción STATs (Ouyang et al. 2011).

Entre sus diversas funciones ejerce efectos supresores sobre células y citoquinas pro-inflamatorias, promueve la supervivencia y acción de Tregs, entre otras. El mal funcionamiento de la señalización por IL-10 está asociado a enfermedades inflamatorias, como la enfermedad inflamatoria intestinal (Kühn et al. 1993) y frecuentemente está asociado a inmunopatologías causadas por infecciones, por ejemplo, esquistosomiasis mansoni (Y. Osada et al. 2019). Más aún, la producción desregulada de IL-10 ya sea en altos o bajos niveles contribuye al estado de inflamación crónica (Ouyang et al. 2019).

Durante la fase aguda de la infección por *T. cruzi*, el control de la intensa respuesta inflamatoria podría ocurrir por mecanismos de inmunorregulación vinculados a los efectos de IL-10 (Dutra et al. 2014). Esta respuesta es suficiente para el control del proceso inflamatorio en la transición hacia la fase crónica asintomática y, a la vez, permite que la respuesta celular se desarrolle para disminuir la parasitemia (Dutra et al. 2014; Acevedo et al. 2018). La

importancia de IL-10 como citoquina inmunoreguladora en la fase aguda ha sido demostrada por estudios en ratones IL-10 KO, que muestran que son más susceptibles a la infección con *T. cruzi* (Alba Soto et al. 2010; Roffê et al. 2012; Pino-Martínez et al. 2019).

En la etapa asintomática de la infección la producción de IL-10 prevalece sobre la de las citoquinas pro-inflamatorias (como IFN γ , IL-17 y TNF α). Por lo tanto, el microambiente que se genera es de tipo anti-inflamatorio. Esta fase representa un balance “ideal” entre hospedador y parásito, dado que el hospedador puede estar infectado por largo tiempo sin desarrollar patología (Bonney et al. 2019).

En la etapa crónica sintomática, el balance entre citoquinas pro-inflamatorias/anti-inflamatorias se desplaza hacia el perfil inflamatorio. En esta etapa hay predominio de citoquinas pro-inflamatorias en relación a IL-10. En varios estudios se ha observado que la patología cardíaca de la enfermedad de Chagas está asociada a una respuesta inflamatoria, tanto local como sistémica, en la cual se observa un incremento de citoquinas pro-inflamatorias como IL-6, TGF β , TNF α , IL-17, que no puede ser contrarrestado por acción de IL-10 (Cardillo et al. 2015; Acevedo et al. 2018; Cerbán et al. 2020).

3.PPAR y agonistas

3.1. Características generales

Los receptores activados por factores de proliferación peroxisomal (PPARs) son factores de transcripción activados por ligando pertenecientes a la superfamilia de receptores de hormonas esteroideas tipo I.

Fueron descubiertos en 1990 en roedores, cuando mediante la clonación de un receptor se observó que se activaban por compuestos xenobióticos que causaban la proliferación de peroxisomas hepáticos (Isseman et al. 1990).

Todos los PPARs tienen un rol importante en la homeostasis energética, principalmente en el metabolismo de lípidos. Además de estas funciones, participan en otros procesos como crecimiento, desarrollo, apoptosis y resolución de la inflamación en distintos tipos celulares (Pazienza et al. 2012; Grygiel-Górniak 2014).

Existen 3 isoformas del receptor: PPAR α , PPAR γ y PPAR β/δ , codificadas por distintos genes ubicados en distintos cromosomas, con alto grado de conservación interespecífica. Estas isoformas se expresan en distintos tejidos y presentan diferentes funciones, lo cual contribuye tanto a la diversificación como a la especificidad de señales (Nielsen et al. 2006; Grygiel-Górniak 2014).

Para que PPAR adquiriera su función como factor de transcripción necesita de la unión del ligando, formar un heterodímero con el receptor nuclear del ácido retinoico (RXR), de la interacción con moléculas co-activadoras y la unión a elementos de respuesta específicos a PPAR (PPREs) en la región promotora del gen blanco (Christofides et al. 2021).

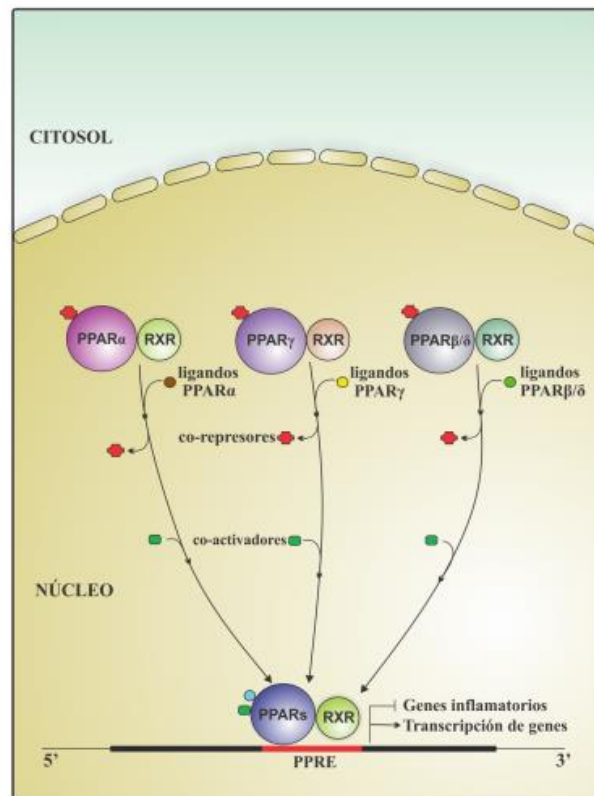


Fig. 6: Mecanismo de activación de PPAR dependiente de ligando (Adaptado de Hovsepian-Penas et al. 2012 (Hovsepian et al. 2012))

PPARα: se expresa principalmente en el hígado, corazón, músculo esquelético, tejido adiposo marrón, intestino y riñón y activa la disipación de energía. Ejerce su efecto biológico sobre el transporte, la esterificación y la oxidación de ácidos grasos, la disipación de energía y la pigmentación (*browning*) del tejido adiposo marrón.

PPARβ/δ: se expresa de forma ubicua. Interviene en la oxidación de los ácidos grasos y la homeostasis de la glucosa. Es la isoforma menos estudiada.

PPARγ: se expresa principalmente en tejido adiposo blanco, hígado, músculo esquelético, intestino y células inmunes. Desempeña su función sobre la homeostasis de la glucosa, el transporte de ácidos grasos, síntesis lipídica, adipogénesis, almacenamiento de energía y termogénesis. Esta isoforma es esencial para el desarrollo y función del tejido adiposo (Christofides et al. 2021; Kim et al. 2023).

3.2. PPARα

En 1990 se identificó a PPARα, miembro de la familia de receptores activados por factores de proliferación peroxisomal (PPAR), cuando en un estudio se observó que, al ser activado por compuestos hipolipemiantes, indujo la proliferación de peroxisomas en roedores (Issemann et al. 1990).

Los ligandos naturales de PPAR α incluyen ácidos grasos saturados, monoinsaturados y poliinsaturados como 8S-HETE y Leucotrieno B4 (Harmon et al. 2011). Además, posee ligandos sintéticos como WY14643 y fibratos (bezafibrato, fenofibrato, entre otros) (Takada et al. 2020). PPAR α cumple un rol en el control del metabolismo energético mediante la regulación de procesos del metabolismo lipídico en respuesta a condiciones nutricionales como el ayuno y la alimentación (Takada et al. 2020). Además, desempeña un rol en procesos no metabólicos, como la diferenciación celular e inflamación. Una de las primeras evidencias de la participación de PPAR α en la regulación de la respuesta inflamatoria fue la observación respecto de la activación de genes involucrados en la ω - y β -oxidación causada por la unión de Leucotrieno B4 (eicosanoide pro-inflamatorio) a PPAR α (Devchand et al. 1996).

Diversos trabajos han demostrado el papel de PPAR α en la regulación de la inflamación en distintos tejidos y patologías. En ratones KO para PPAR α sometidos a una dieta alta en grasa se observaron mayores niveles de expresión de marcadores de inflamación aguda y de injuria, mayor expresión de genes pro-inflamatorios y un aumento de macrófagos infiltrantes en hígado comparado con ratones WT (Stienstra et al. 2007). En otro estudio se demostró que la activación de PPAR α con el agonista sintético WY14643 disminuye la expresión de genes pro-inflamatorios en un modelo de explantes de cartílago humano (Clockaerts et al. 2011).

Se ha reportado que PPAR α cumple un rol importante en eventos moleculares de la cardiomiopatía diabética en modelos murinos (Wang et al. 2021).

En un modelo murino de diabetes tipo 1 el tratamiento con fenofibrato disminuye significativamente la disfunción cardíaca y la inflamación a través de la regulación positiva de la vía FGF21 y mejorando la autofagia mediada por situina 1 (Zhang et al. 2016).

La expresión de PPAR α también ha sido descrita en algunas poblaciones de células del sistema inmune y sobre las cuales parece tener un efecto anti-inflamatorio. Bajo condiciones de cultivo con LPS/IFN γ , los macrófagos peritoneales de ratones KO para PPAR α muestran un aumento significativo de distintos parámetros inflamatorios (Crisafulli et al. 2009).

Penas et al. reportaron que el tratamiento *in vitro* con WY14643 promueve, en macrófagos peritoneales de ratones infectados con *T. cruzi*, el cambio de fenotipo de M1 a M2 (Penas et al. 2015).

Dado que PPAR α es un factor de transcripción implicado en distintas enfermedades como cáncer, síndromes metabólicos y enfermedades autoinmunes, resulta un blanco de interés para diversos tratamientos contra estas enfermedades. En este sentido se han desarrollado y estudiado diversos ligandos sintéticos para los receptores PPAR α . Entre ellos se encuentran los fibratos, agonistas sintéticos de PPAR α , que son utilizados para el tratamiento de dislipidemias.

3.3. Fenofibrato

Fenofibrato (propan-2-il 2-[4-(4-clorobenzoil) fenoxi]-2-metilpropanoato) es un derivado sintético del ácido fenoxi-isobutírico de tercera generación (NCI Thesaurus. NIH 2017), actualmente utilizado en la clínica médica como agente hipolipemiante para el tratamiento de hipertrigliceridemia como factor promotor de la aterosclerosis (Ling et al. 2013).

Como se mencionó anteriormente, este ligando, además de disminuir los niveles de triglicéridos, tiene propiedades anti-inflamatorias en distintos órganos como hígado, riñones y corazón (Balakumar et al. 2019; Christofides et al. 2021).

Fenofibrato ejerce acciones pleiotrópicas en el tejido cardíaco. Ha sido reportado que aumenta la expresión de PPAR α y suprime la hipertrofia de los cardiomiocitos (Balakumar et al. 2011). Otro estudio *in vitro* mostró que tiene la capacidad de proteger contra la hipertrofia cardíaca inducida por endotelina-1 (Jen et al. 2016).

Se ha demostrado que fenofibrato es capaz de reducir la razón entre el peso del corazón y el peso corporal y el grosor de la pared del ventrículo izquierdo en un modelo de hipertensión inducida por constricción de la aorta abdominal en ratas (Zeng et al. 2018).

Fenofibrato también tiene el potencial de reducir la falla cardíaca en un modelo de falla inducida por isoproterenol en ratas, que podría ser causado por la oxidación de ácidos grasos (Li et al. 2015).

Los ligandos sintéticos de PPAR α ejercen efectos sobre la respuesta inflamatoria. En trabajos del grupo se ha descrito que ligandos de PPAR α y PPAR γ son capaces de inducir el cambio de fenotipo en macrófagos peritoneales, de un fenotipo inflamatorio a uno reparador (Penas et al. 2015; Rada et al. 2020). Cevey et al (Cevy et al. 2017) han reportado que fenofibrato es capaz de mejorar la función ventricular y disminuir parámetros inflamatorios en un modelo murino de la enfermedad de Chagas.

A pesar de la gran cantidad de evidencias que se reporta sobre las propiedades anti-inflamatorias de fenofibrato, aún quedan interrogantes sobre cuáles son las vías a través de las que actúa para llevar a cabo dichas acciones.

OBJETIVOS

Objetivo general:

Estudiar el efecto modulador de fenofibrato sobre la respuesta inmune en diferentes modelos de Chagas experimental.

Objetivos específicos:

1. Evaluar los efectos de fenofibrato en la modulación de la respuesta inmune en un modelo de infección con dos cepas de *T. cruzi*.
 - 1.1. Evaluar las características del modelo de infección mixta según antecedentes
 - 1.2. Estudiar los efectos del tratamiento con fenofibrato sobre el balance Treg/Th17.
 - 1.3. Estudiar los efectos del tratamiento con fenofibrato sobre IL-10 y su receptor.
 - 1.4. Evaluar los efectos del tratamiento con fenofibrato sobre la expresión de marcadores de perfil reparador.
2. Estudiar los efectos antiinflamatorios del fenofibrato, dependientes e independientes de IL-10.
 - 2.1. Caracterizar el modelo de infección mixta en ratones IL-10 KO.
 - 2.2. Desarrollar y caracterizar el modelo de infección con el clon K98 de la cepa CA-I en ratones IL-10 KO.
 - 2.3. Estudiar el papel de fenofibrato sobre los infiltrados inflamatorios en corazones de ratones IL-10 KO.
 - 2.4. Evaluar los efectos de fenofibrato sobre la fibrosis cardíaca en ratones IL-10 KO.
 - 2.5. Evaluar la expresión de citoquinas proinflamatorias y el efecto de fenofibrato en el modelo de infección de IL-10 KO.
 - 2.6. Correlacionar mediadores inflamatorios con la disfunción ventricular y los efectos de fenofibrato.
 - 2.7. Evaluar los efectos de fenofibrato sobre la expresión de marcadores de perfil reparador en ratones IL-10 KO.
 - 2.8. Estudiar el papel de fenofibrato sobre la expresión de ROR γ t y FOXP3 en el corazón de ratones IL-10 KO.

MATERIALES Y MÉTODOS

1. Ratones

Las líneas de ratones empleadas en este trabajo de tesis fueron mantenidas en el bioterio del Instituto de Investigaciones en Microbiología y Parasitología Médica (IMPaM, UBA-CONICET) en el Departamento de Microbiología, Inmunología y Parasitología de la Facultad de Medicina de la UBA.

Todos los procedimientos que involucraron animales fueron realizados siguiendo las normas establecidas por el CICUAL (Comité Institucional para el Cuidado y Uso de Animales de Laboratorio, Facultad de Medicina, UBA). A su vez, estos procedimientos fueron aprobados por el comité de ética del CONICET acorde con las guías de ANMAT y SENASA, basadas en la guía de uso y cuidado de animales de laboratorio del Instituto de Salud de los Estados Unidos (NIH, USA).

1.1. Ratones CF1

Se usaron ratones CF1, exocriados, para realizar el mantenimiento de las cepas y clones de *T. cruzi*, mediante pasaje seriado de ratones infectados a ratones sanos (Sección 2.3).

1.2. Ratones BALB/c

Ratones BALB/c *wild type* (WT) fueron utilizados para los dos modelos de ensayos *in vivo* realizados en este trabajo.

Los ratones *knockout* para Interleuquina 10 (IL-10 KO) son homocigotas para la mutación dirigida *IL-10tm1Cgn* y de *background* BALB/c (Stock N°004333; The Jackson Laboratory, USA). Estos ratones modificados genéticamente son útiles para el estudio de enfermedades inflamatorias intestinales (como la enfermedad de Chron), cáncer, inmunidad innata y adaptativa (The Jackson Laboratory, “BALB/c IL-10 KO.” [Online]. Available: <https://www.jax.org/strain/004333>).

2. Cepas de *Trypanosoma cruzi*

2.1. Cepa CA-I clon K98

La cepa CA-I de *T. cruzi* fue aislada de un paciente con cardiomiopatía chagásica crónica (González Cappa et al. 1980) y forma parte del Linaje I, UDT TcI. El clon K98 fue aislado por la Dra. Ana Celentano a partir de la cepa CA-I (Celentano et al. 1993). Tanto la cepa CA-I como el clon K98 se comportan de manera miotrópica (Muller et al. 1986; Celentano et al. 1993) y son de baja virulencia, por lo cual no son letales para el ratón independientemente del inóculo.

2.2. Cepa RA

La cepa RA de *T. cruzi* fue aislada de un paciente pediátrico proveniente de General Pico (La Pampa, Argentina) que cursaba la fase aguda de la enfermedad de Chagas (González Cappa et al. 1981) y forma parte del linaje II, UDT TcVI. Es una cepa altamente virulenta y letal para el ratón cuando se inocula por vía intraperitoneal con 500 o más parásitos en una primoinfección. Se comporta de manera pantrópica (Mirkin et al. 1997) y reticulotrópica (Muller et al. 1986; Celentano et al. 1993).

2.3. Obtención de *Trypanosoma cruzi* en estadio tripomastigote

Ratones de la cepa CF1 machos de 21 días de edad fueron infectados por vía intraperitoneal con tripomastigotes del clon K98 de la cepa CA-I o con tripomastigotes de la cepa RA de *T. cruzi*. Los tripomastigotes fueron purificados a partir de sangre obtenida por punción cardíaca, de ratones CF1 machos, sacrificados mediante inhalación de CO₂ gaseoso en el pico de parasitemia (42 días post-infección, dpi), en el caso del clon K98 de la cepa CA-I, y a los 7 dpi en el caso de la cepa RA) (González Cappa et al. 1981).

3. Modelo murinos de infección

3.1. Modelo de infección mixta con dos cepas de *Trypanosoma cruzi*

En nuestro laboratorio desarrollamos un modelo de infección con dos cepas de *T. cruzi*, que reproduce características de la etapa crónica sintomática. En este modelo se incluyen 2 grupos experimentales: ratones sin infectar (grupo control) y ratones infectados con *T. cruzi* (grupo Tc). Por otra parte, para los estudios del papel del fenofibrato durante el curso de la infección, se incluye un tercer grupo: ratones infectados y tratados con el fármaco (grupo Tc+F).

En el modelo de infección mixta, ratones BALB/c de 8 semanas de edad fueron inoculados con 1×10^5 tripomastigotes del clon K98 de *T. cruzi*, por vía intraperitoneal. A las 6 semanas pi, que coincide con el pico de parasitemia, los ratones fueron re infectados con 100 tripomastigotes de la cepa RA por vía intraperitoneal. Este modelo nos brinda la posibilidad de evaluar el efecto del tratamiento con fenofibrato sobre distintos parámetros de la función ventricular.

Para establecer si la infección provocaba daño o disfunción cardíaca, en la semana 10 pi se realizó un estudio ecocardiográfico, mediante el cual se midieron distintos parámetros de función ventricular y se calcularon a partir de éstos la fracción de eyección (FE) y la fracción de acortamiento (FA) (Cevey et al. 2017). Ante la evidencia de disfunción ventricular en la semana 10 pi se inició el tratamiento con fenofibrato en una dosis diaria de 100 mg/kg durante 4 semanas. Al finalizar el tratamiento en la semana 14 pi se realizaron nuevamente los estudios ecocardiográficos para evaluar el efecto del tratamiento con fenofibrato sobre la disfunción ventricular.

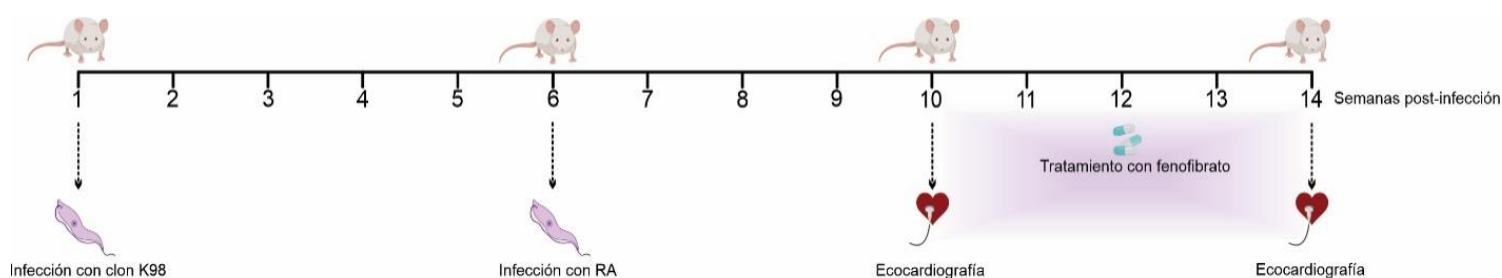


Fig. 1: Modelo de infección mixta: ratones BALB/c son inoculados con 1×10^5 tripomastigotes del clon K98 y 6 semanas pi son inoculados con 100 tripomastigotes de la cepa RA. En la semana 10 pi se realizan estudios ecocardiográficos y se inicia el tratamiento con fenofibrato por 4 semanas en una dosis diaria de 100 mg/kg. Al finalizar el ensayo en la semana 14 pi se realizan nuevamente estudios ecocardiográficos.

3.2. Modelo de infección con el clon K98 de *Trypanosoma cruzi* en ratones IL-10 KO

Para poder evaluar el rol potencial de IL-10 en los efectos de fenofibrato desarrollamos un modelo de infección con el clon K98 utilizando ratones BALB/c de 8 semanas IL-10 KO y WT como control. En este modelo murino se emplean 6 grupos experimentales: ratones IL-10 KO sin infectar (grupo IL-10 KO control), ratones IL-10 KO infectados con *T. cruzi* (grupo IL-10 KO Tc), ratones IL-10 KO infectados con *T. cruzi* y tratados con fenofibrato (grupo IL-10 KO Tc+F), ratones WT sin infectar (grupo WT control), ratones WT infectados con *T. cruzi* (grupo WT Tc), ratones WT infectados con *T. cruzi* y tratados con fenofibrato (grupo WT Tc+F).

Los ratones fueron inoculados con 1×10^5 tripomastigotes del clon K98 por vía intraperitoneal.

A la semana 5 pi se realizó el estudio ecocardiográfico para evaluar si la infección causó daño cardíaco funcional. Dado que se observó disfunción cardíaca, se inició el tratamiento con fenofibrato con una dosis diaria de 100 mg/Kg por 4 semanas.

Al finalizar el tratamiento (semana 9 pi) se realizaron nuevamente los estudios ecocardiográficos.

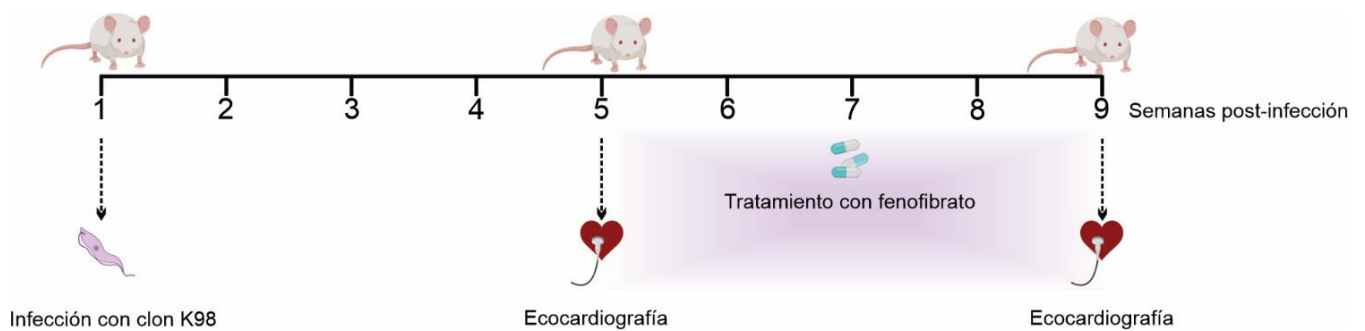


Fig. 2: Modelo de infección con clon K98: ratones BALB/c IL-10 KO y ratones WT son inoculados con 100 tripomastigotes del clon K98. En la semana 5 pi se realizan estudios ecocardiográficos y se inicia el tratamiento con fenofibrato por 4 semanas en una dosis diaria de 100 mg/kg. Al finalizar el ensayo en la semana 9 pi se realizan nuevamente los estudios ecocardiográficos.

4. Detección de la parasitemia

Se evaluó la presencia de tripomastigotes en sangre mediante el método de microhematocrito (Freilij et al. 1983), en la segunda semana de infección, tanto para el modelo de infección mixta como para el modelo de infección única, que designamos como mono infección de ahora en más. A partir de la tercera semana, para ambos modelos, se evaluó la parasitemia mediante el método de Pizzi modificado por Brener (Brener 1962) y se expresa como parásitos por mililitro de sangre.

5. Registro del peso corporal y del corazón

Los ratones fueron pesados semanalmente en una balanza granataria Sartorius, modelo AY212 (Goettingen, Alemania; 200 gr x 0.01 gr).

El peso fue registrado en gramos (gr).

Para el modelo de infección con el clon K98 en ratones IL-10 KO, además de registrar el peso corporal, también se registró el peso del corazón al finalizar el experimento.

Luego de sacrificar el ratón mediante inhalación de dióxido de carbono (CO₂), se extrajo el corazón, se eliminó el remanente de sangre, se pesó en la balanza mencionada y el peso se registró en miligramos (mg) en una planilla de cálculo.

Se obtuvo la razón entre peso cardíaco y peso corporal para cada uno de los ratones de cada uno de los grupos experimentales: ratones sin infección, ratones infectados y ratones infectados y tratados, tanto WT como IL-10 KO. Esta razón se registró en la planilla de cálculo previamente mencionada.

6. Supervivencia

La supervivencia fue evaluada diariamente, hasta el final de los ensayos, en ambos modelos de infección. Mediante la prueba estadística de Kaplan-Meier se determinaron las diferencias entre los grupos estudiados.

7. Ecocardiografía

La ecocardiografía transtorácica fue realizada utilizando un equipo de ultrasonido Acuson Sequoia C 512, con un transductor lineal de 14-MHz. Los experimentos ecocardiográficos fueron realizados bajo una anestesia suave (287,5 mg/kg de 2,2,2-Tribromoetanol 2,5%; Sigma-Aldrich). El plano de imagen de eje corto paraesternal bidimensional se utilizó para obtener trazados en modo M al nivel de los músculos papilares. Las dimensiones internas y el espesor de la pared del ventrículo izquierdo fueron determinados en sístole y diástole usando métodos y recomendaciones de la Sociedad Americana de Ecocardiografía (Sahn et al. 1978). La fracción de eyección (FE) y fracción de acortamiento (FA) fue calculada usando índices eyectivos de la función sistólica. La FE fue estimada a partir de las dimensiones del ventrículo izquierdo por el método de cubos, utilizando la fórmula: $FE (\%) = [(DDVI3 - DSVI3) / DDVI3] \times 100$, FA (%) = $[(DDVI - DSVI) / DDVI] \times 100$, siendo DDVI el diámetro de fin de diástole y DSVI el diámetro de fin de sístole. El tiempo de relajación isovolumétrica (TRIV) fue medido a partir de estudios de Eco-Doppler. Estos ensayos fueron realizados por el Dr. Martín Donato y el Dr. Ricardo Gelpi del Instituto de Fisiopatología Cardiovascular (Facultad de Medicina de la Universidad de Buenos Aires) con nuestra asistencia, como parte de la colaboración establecida.

8. Citometría

Para la identificación de células T CD4 reguladoras (Treg) se realizó la marcación de superficie e intracitoplasmática de marcadores del fenotipo de dicha población linfocitaria.

Las suspensiones celulares provenientes de bazo se obtuvieron mediante la disgregación mecánica del órgano con una malla y émbolo dispuestos en una caja de Petri con 5 ml de medio RPMI completo (RPMIc: corresponde al medio RPMI-1640 y se le agrega antibiótico y 10 % de suero fetal bovino). La suspensión celular fue recuperada con pipeta, se colocó en un tubo Falcon con 5 ml de RPMIc y se lavó mediante centrifugación a 200 xg durante 10 minutos (min) a 4°C. Se descartó el sobrenadante y el pellet se resuspendió en 3 ml de buffer de

hemólisis (CINH_4 , 0,83% en Tris-ClH, pH 7,4) para eliminar los eritrocitos y se incubó por 10 minutos en hielo. El proceso de hemólisis se detuvo con el agregado de 7 ml de Buffer FACS y se centrifugó por 10 min a 200 xg, a 4°C. Se descartó el sobrenadante y el pellet se resuspendió en 1 ml de Buffer FACS (PBS conteniendo 1% albúmina sérica bovina, 0,1% azida sódica y 1% de sobrenadante de un hibridoma de rata que produce el anticuerpo monoclonal 2.4G2 (anti-Fc γ R, CD16/32 de ratón)).

El recuento celular se realizó en cámara de Neubauer. Para evaluar la viabilidad celular se utilizó una solución de Azul de Trypan 0,2% en 1X PBS, a fin de distinguir entre células vivas (cristalinas y refringentes) y muertas (opacas y celestes/azules).

Luego se calculó el volumen de buffer FACS a agregar obtener una concentración de 1×10^7 células/ml. Cien μl de esa suspensión, conteniendo 1×10^6 se emplearon en el protocolo del kit de citometría para la marcación de antígenos de superficie e intracitoplasmáticos de Treg (Treg Detection Kit CD4/CD25/FOXP3, mouse MACS MiltenyiBiotec, BergischGladbach, Alemania).

Marcación de superficie: las células se resuspendieron en 90 μl de buffer FACS y se agregaron los anticuerpos para marcar CD4 (FITC) CD25 (PE) y CD39 (PE/Cy7). Se incubó por 10 min en oscuridad a 4°C y se lavaron a 300 xg por 5 min a 4°C.

Marcación intracitoplasmática: las células se resuspendieron en buffer de fijación y permeabilización (provisto por el kit), y se incubaron por 30 min en oscuridad a 4°C. Luego se lavaron y a continuación se agregó buffer de permeabilización (provisto por el kit) y se lavaron a 300 g por 5 min a 4°C. Se incubó por 5 min en oscuridad a 4°C con buffer de permeabilización y luego se agregó el anticuerpo para la marcación de FOXP3 (APC), se incubó por 30 min en oscuridad a 4°C.

Finalmente, las células se lavaron con buffer de permeabilización a 300 xg por 5 min a 4°C. se aspiró completamente el sobrenadante y se resuspendió en una solución de PBS-PFA 4% para la fijación de las células.

La adquisición de los datos de las muestras se realizó en un citómetro FACS Canto II (Becton-Dickinson, BD Biosciences, NJ, USA). El análisis de los datos se realizó con los programas FlowJo v10 (BD Biosciences, NJ, USA) y con Weasel, versión 3.4 (The Walter & Eliza Hall Institute of Medical Research, Victoria, Australia).

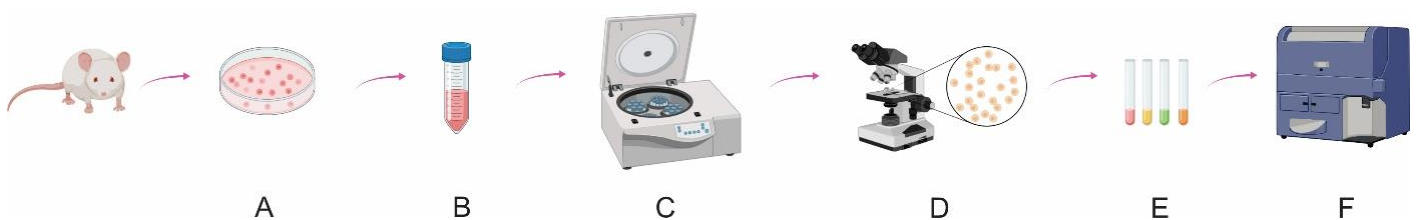


Fig. 3: Esquema de trabajo para citometría de flujo: las suspensiones de esplenocitos totales se obtienen mediante disgregación mecánica (A). Las células se lavan con medio RPMIc y luego se agrega buffer de hemólisis (B). Para detener el proceso de hemólisis se lavan con buffer FACS y se centrifugan (C). Posteriormente se realizó el recuento celular en cámara de Neubauer (D). Luego se realizaron las marcaciones de superficie e intracitoplasmáticas de las células utilizando un kit comercial para determinar la población de células Treg (E). La adquisición de los datos se realizó en un citómetro FACS Canto III (F).

Se emplearon 3 abordajes metodológicos con las suspensiones de esplenocitos para la evaluar la frecuencia de las células Treg mediante citometría de flujo.

Abordaje 1: obtención de esplenocitos totales y marcación *ex vivo* con el kit comercial, como se describió previamente y se analizaron en el citómetro de flujo.

Abordaje 2: obtención de esplenocitos totales, que se estimularon *in vitro* por 72 hs con PMA e Ionomicina, para permitir la expansión celular. Luego de las 72 hs de incubación se recuperaron las células, se realizó la marcación celular y se analizaron en el citómetro.

Abordaje 3: obtención de esplenocitos, que se estimularon *in vitro* por 96 hs con Anti-CD3, Anti-CD28, TGF β e IL-2, para imitar las condiciones que del microambiente propicio para la diferenciación de linfocitos hacia el fenotipo de célula Treg. Luego, las células fueron recuperadas, se realizó la marcación celular y se evaluaron por citometría de flujo.

Para los 3 abordajes metodológicos se utilizó la siguiente estrategia de *gating* para determinar la población celular:

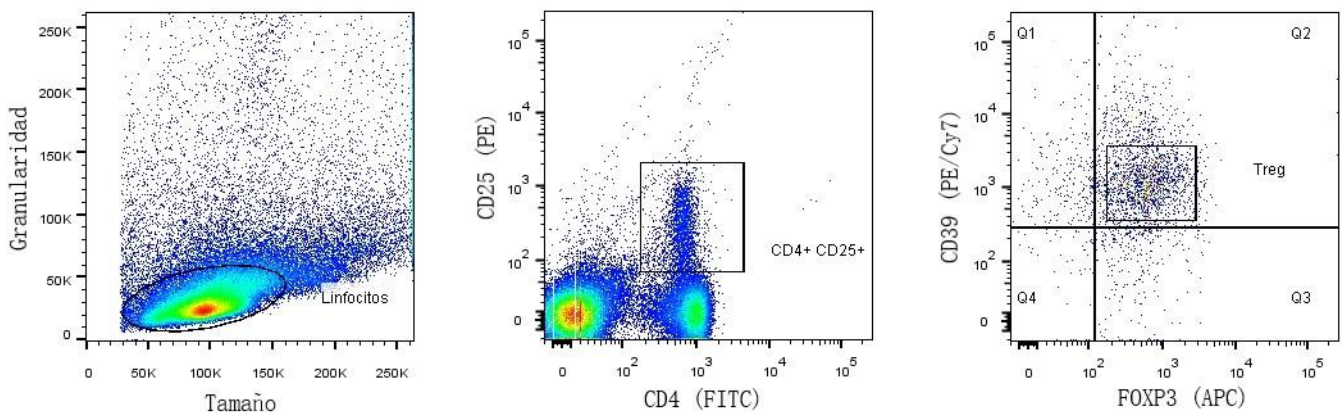


Fig. 4: Estrategia de *gating* utilizada para el análisis de las poblaciones linfocitarias: para analizar la población linfocitaria de interés, las células Treg, se utilizó la siguiente estrategia de *gating*. Primero se seleccionó la nube que corresponde a la población de linfocitos de acuerdo al tamaño y la granularidad de las células. Sobre esa población se aplicó un segundo *gate* para determinar las células CD4⁺ CD25⁺. Finalmente, sobre esta última población se aplicó un *gate* para seleccionar las células FOXP3⁺ y CD39⁺.

9. Histología

Una vez sacrificados los animales se procedió a la extracción del corazón que se fijó en paraformaldehído (PFA) 4% en PBS, Luego las muestras fueron incluidas en parafina para su posterior tratamiento para las tinciones histológicas.

Las evaluaciones histológicas se llevaron a cabo en secciones de aproximadamente 4-5 μ m de espesor a 6 niveles distintos dentro del tejido. Dichos niveles presentaron una separación entre 50 y 100 μ m. Todas las secciones se realizaron por duplicado.

Las muestras fueron examinadas mediante el microscopio Nikon Eclipse E600 (Nikon Inc., NY, USA). Las imágenes fotográficas fueron capturadas usando la cámara digital Spot RT Slider (Diagnostic Instruments, Inc., MI, USA). Se evaluaron 30 campos al azar por cada una de las secciones con un aumento de 400X.

9.1. Hematoxilina-eosina

Se utilizó esta tinción para evaluar el tamaño, la dispersión (focales/dispersos) y localización (intersticiales/perivasculares) de los infiltrados inflamatorios en el miocardio.

9.2. Rojo Picrosirio

Se utilizó esta tinción para evaluar el grado y la localización de la fibrosis que se puede presentar en el tejido cardíaco.

10. Cuantificación relativa de ARN mensajero

10.1. Extracción de ARN total y cuantificación

Los órganos extraídos (Bazo y corazón) de los ratones fueron mantenidos a -80°C hasta su procesamiento para la obtención de ARN total.

La extracción de ARN total a partir de tejido cardíaco y de tejido linfóide se realizó con Quickzol (Kalium Technologies, (BsAs, Argentina)) de acuerdo a las recomendaciones del fabricante. El ARN obtenido se trató con DNasa, que degrada el ADN de simple y doble cadena.

La concentración de ARN total obtenido se determinó por espectrofotometría de absorbancia a 260 nm y la pureza del mismo se determinó mediante la relación de absorbancias 260 nm/280 nm, considerando como un buen grado de pureza del ARN cuando la relación entre las absorbancias era cercana a 2.

10.2. Retrotranscripción a ADN complementario

El ARN total (1 μg por muestra) fue retrotranscripto a ADN complementario (ADNc) utilizando M-MLV Reverse Transcriptase® (Promega, Biodynamics) junto a OligodT, deoxinucleótidos y un inhibidor de ARNasas de acuerdo a las especificaciones del fabricante.

10.3. qRT-PCR

Los ensayos de qRT-PCR se llevaron a cabo con el reactivo Evagreen utilizando el bloque térmico de ciclado Applied Biosystem Step One Plus™ Real-Time PCR System.

Las muestras fueron normalizadas con ARN ribosomal (ARNr) del gen 18S o ARN mensajero (ARNm) de actina.

Los valores de expresión cuantitativa, para qRT-PCR fueron extrapolados a partir de las curvas patrón 18 S o curva patrón de actina, por duplicado. La cuantificación y eficiencia de las reacciones de qRT-PCR se determinaron mediante el método comparativo $2^{-\Delta\Delta\text{Ct}}$ (Schmittgen et. al 2008). Los valores obtenidos fueron promediados con los replicados en cada reacción y las veces de inducción fueron determinadas considerando 1 al valor obtenido en el tiempo cero. El protocolo de ciclado para los ensayos de qRT-PCR se muestra en la Tabla 1:

Cantidad de ciclos	Temperatura (°C)	Tiempo
1	52	2 min
1	95	15 min
40	95	15 seg
	Temperatura de fusión específica del <i>primer</i>	30 seg
	72	1 min
Curva de Disociación: 95 °C x 15 min, 60 °C x 1 min, 95 °C x 15 seg		

Tabla 1: Protocolo de ciclado para ensayos de qRT-PCR.

10.4. Primers

Las secuencias de los *primers* (también denominados cebadores) para qRT-PCR se diseñaron de acuerdo al siguiente protocolo: se buscó la secuencia del gen de interés que se quiso amplificar en la base de datos Nucleotide de Pubmed (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed>, NIH, USA). Dicha secuencia se analizó con el programa Oligo Primer Analysis Software 6 (Molecular Biology Insights Inc., USA) que permitió obtener las secuencias de los *primers* sentido (*forward*) y anti-sentido (*reverse*). Además, se realizó un análisis de PCR *in silico*, para confirmar que solo se amplifique el producto de interés. Por último, se realizó un análisis para evaluar si los cebadores se encontraban en exones diferentes, para tener la certeza de que se está amplificando el transcrito maduro (luego del *splicing* alternativo), utilizando los datos de la página web: <http://www.ensembl.org>.

Las secuencias y las temperaturas de fusión (T_m) de los *primers* utilizados se muestran en la siguiente tabla (Tabla 2):

Gen	Foward (5'-3')	Reverse (5'-3')	Tm (°C)
18S	AACACGGGAAACCTCACCC	CCACCAACTAAGAACGGCCA	60
Actina	GGCTGTATTCCCCTCCATCG	CCAGTTGGTAACAATGCCATGT	63
IL-6	TGATGCACTTGCAGAAAACAA	GGTCTTGGTCCTTAGCCACTC	60
IL-10	CTCCCCTGTGAAAATAAGAGCA	TCCAGCAGACTCAATACACACT	60
IL-10R	TGTTTACTTATCACGACGGA	GACCAGGACTGTAGGCAACTT	56
IL-2	AGCAACTGTGGTGGACTTT	GGAGGTACATAGTTATTGAGG	56
FOXP3	TGTTTCGCCTACTTCAGAAACCAC	CTCCCTTCTCGCTCTCCACTC	64
RORyt	GCAAGTCCTTCCGAGAGA	GTGTGGTTGTTGGCATTGTAG	58
NOS2	CACAGCAATATAGGCTCATCCA	GGATTTGAGCCTCATGGTAAAC	60
CTGF	CCTAAAATCGCCAAGCCTGT	CACCCCGCAGAACTTAGCC	61
TGFβ	CACCGGAGAGCCCTGGATA	TGTACAGCTGCCGCACACA	64
TNFα	CGGGCAGGTCTACTTTGGAG	ACCCTGAGCCATAATCCCCT	62
CD206	CAAGGAAGGTTGGCATTGT	CCTTTCAGTCCTTTGCAAGC	60
Fizz	CCCTTCTCATCTGCATCTC	CAGTAGCAGTCATCCCAGCA	58
Ym1	GGATGGCTACACTGGAGAAA	AGAAGGGTCACTCAGCATAA	58

Tabla 2: Secuencias *foward* y *reverse* de los *primers* utilizados

11. Extracción de proteínas totales

Los corazones se disgregaron con dispersor Ultra-Turrax (IKA-Werke, Alemania) en 300 µl de buffer de lisis RIPA modificado (composición del buffer mostrada en la Tabla 3). Las muestras se incubaron a 4 °C por 30 min en agitación constante y luego se centrifugaron a 4 °C a 7000 xg por 15 min. Se recuperaron los sobrenadantes y se guardaron en tubos eppendorfs a -20°C.

BUFFER DE LISIS RIPA MODIFICADO	
NaCl	150 mM
Tris HCl pH: 7,4	50 Mm
Triton X-100	1%
EDTA	1 mM
PMSF	1 mM
Aprotinina Peptasina Leupeptina	2,5 mg/ml
Na ₃ VO ₄	1 mM
NaF	4,1 mM

Tabla 3: Composición del buffer RIPA modificado

12. Cuantificación de proteínas

La cuantificación de proteínas se determinó por el método de Bradford (Bradford MM 1976) utilizando el reactivo Bio-Rad Protein Assay Dye Reagent Concentrate (Bio-Rad Laboratories, Inc. USA) y albúmina sérica bovina (BSA) (1 mg/ml) como estándar, para establecer la curva patrón.

La concentración de proteínas se determinó mediante interpolación de las absorbancias de las muestras, a partir de la curva patrón, cuyo rango de concentraciones fue entre 0 y 50 µg/ml. La absorbancia de las muestras fue medida a una longitud de onda de 595 nm en un espectrofotómetro (Thermo Scientific).

13. Western Blot

Los extractos de proteínas totales, previos a ser sometidos a electroforesis, fueron incubados a 95°C durante 5 min con Buffer de Laemmli (Tris-HCl 60 mM pH 6,8, SDS 2%, Glicerol 10%, β-mercaptoetanol 3% y Azul bromofenol 0,005%).

Las muestras conteniendo la misma cantidad de proteína (50 µg) fueron sometidas a electroforesis por 90 min a 90-120 volts, en condiciones desnaturalizantes en geles con 10 % SDS-poliacrilamida (acrilamida/bisacrilamida, 29:1). Finalizada la electroforesis las proteínas fueron transferidas a una membrana Immobilon-P, a una intensidad constante de 400 mA por 120 min. Las membranas a continuación fueron bloqueadas utilizando una solución de leche en polvo descremada al 5% en PBS 1X, en agitación lenta constante durante una hora a temperatura ambiente. Luego, las membranas se incubaron, en agitación lenta constante, a 4°C durante la noche con anticuerpos primarios en diluciones específicas. Transcurrido este tiempo las membranas se realizaron 3 lavados de 15 min cada uno con PBS-Tween (PBS 1X y Tween 20 0,1%) y se incubaron durante 1 hora a temperatura ambiente con el anticuerpo secundario conjugado con peroxidasa. Finalizada esta incubación se realizaron 3 lavados de 10 min cada uno con PBS-Tween. Las membranas fueron tratadas con los reactivos quimioluminiscentes (Sigma-Aldrich Co.) para su revelado el cual se realizó en BioSpectrum® 815 Imaging System (UVP, Upland, CA, USA) siguiendo las instrucciones del fabricante. La intensidad de las bandas se analizó utilizando el programa Image J (NIH, USA).

14. ELISA

La concentración de IL-6, IL-10, IL-17 y TNFα fue determinada por ELISA, en suero de ratones control, infectados e infectados y tratados, de acuerdo con lo detallado por los fabricantes (Kits de IL-6, IL-10 y TNFα de BD Biosciences y el kit para IL-17 de BioLegend). La reacción fue detectada utilizando Streptavidina conjugada con HRP en una dilución de 1:1000. Luego se agregó una solución del cromógeno ABTS, 2,2'-Azino-bis (3-Ethylbenzthiazoline-6-Sulfonic Acid), se colocó la placa de en oscuridad por lo menos 30 min y luego se midió la absorbancia a 405 nm, restando la absorbancia basal. La concentración (pg/ml) presente en cada muestra se calculó a partir de la curva patrón de cada citoquina.

15. Actividad sérica de Creatina Kinasa

La actividad de creatina kinasa (CK) fue medida en el suero de ratones control, Tc y Tc+F tanto WT como IL-10 KO usando un kit comercial que utiliza un método colorimétrico basado en el ensayo de la reducción fotométrica de NADP (Nicotidamina Adenina Dinucleótido Fosfato) siguiendo las indicaciones del fabricante (Wiener Lab, Rosario, Argentina). La absorbancia fue medida a 340 nm en un espectrofotómetro.

16. Análisis estadísticos

El test Kaplan-Meyer fue utilizado para analizar las diferencias de mortalidad entre los distintos grupos experimentales.

Para los distintos parámetros estudiados, las diferencias entre los grupos de ratones no infectados, infectados o infectados y tratados se analizaron mediante ANOVA de un factor y las comparaciones múltiples *a posteriori* se evaluaron mediante una prueba de Tukey.

Los resultados se expresan como la media de tres experimentos independientes $\pm$ error estándar de la media.

El test de Spearman fue empleado para evaluar la correlación entre la concentración sérica de IL-6, TNF α e IL-17 o la expresión del ARN mensajero de IL-6, TNF α , NOS2 y TGF β y la FE o FA.

Las diferencias se consideraron estadísticamente significativas cuando $p < 0,05$.

Todos los análisis fueron realizados utilizando el Software Prism 7.00 (GraphPad, USA).

RESULTADOS

CAPÍTULO 1:

1. ROL DE FENOFIBRATO EN LA MODULACIÓN DE LA RESPUESTA INMUNE

1.1. Modelo murino de infección mixta y tratamiento: Antecedentes

Teniendo en cuenta los antecedentes sobre la cardiopatía chagásica crónica, en nuestro laboratorio se desarrolló un modelo murino de infección mixta utilizando dos cepas de *T. cruzi* de diferente DTU y distinta virulencia. Este modelo de trabajo reproduce características funcionales de la etapa crónica sintomática de la enfermedad de Chagas. En dicho modelo se determinó que el tratamiento con benznidazol y fenofibrato como coadyuvante, previene la disfunción ventricular llevando los parámetros cardíacos a valores normales (Cevey et al. 2017).

En este trabajo de tesis se utilizó dicho modelo de infección mixta para evaluar los efectos del tratamiento con fenofibrato sobre la modulación de la respuesta inmune. A modo de control y seguimiento del modelo se llevaron a cabo las determinaciones que se detallan a continuación y que sientan los antecedentes sobre los cuales se prosiguió con este trabajo de tesis doctoral.

1.1.1. Determinación de la parasitemia y peso corporal

Para el modelo de infección mixta se utilizaron ratones BALB/c, que fueron distribuidos al azar en tres grupos experimentales:

1. Ratones control (C): ratones no infectados.
2. Ratones infectados (Tc): ratones infectados con las dos cepas de *T. cruzi* que no reciben tratamiento con fenofibrato de acuerdo al esquema experimental que se detalló en la sección de materiales y métodos.
3. Ratones infectados y tratados (Tc+F): ratones infectados con las dos cepas de *T. cruzi* que reciben tratamiento con fenofibrato de acuerdo al esquema experimental que se detalló en la sección de materiales y métodos.

La parasitemia, medida como parásitos/ml (p/ml), aumentó desde la semana 3 pi hasta la semana 7 pi, cuando presentó el pico máximo. A partir de ese momento fue disminuyendo hasta la semana 10 y el número de parásitos/ml se mantuvo bajo y relativamente constante hasta el final del ensayo, tanto en ratones Tc, como en ratones Tc+F. No se observaron diferencias entre los grupos experimentales (Fig. 1).

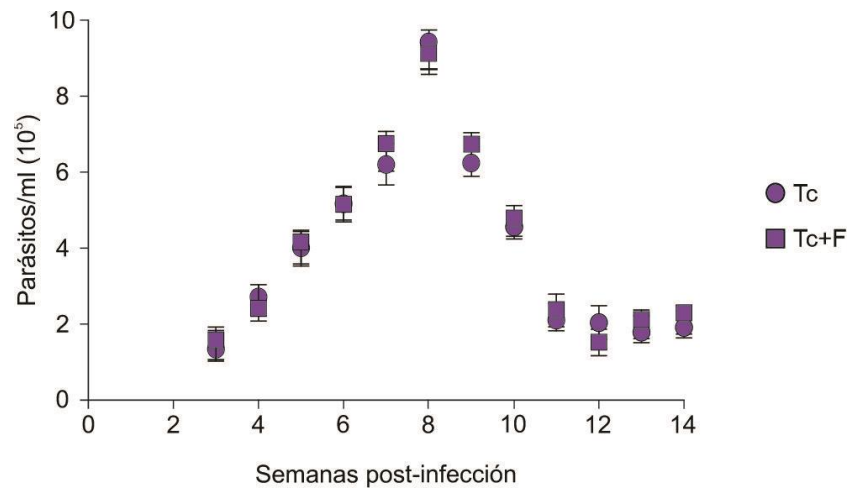


Fig. 1: Curva de parasitemia. La parasitemia fue evaluada por el método de Pizzi modificado por Brener, desde la semana 3 pi hasta la semana 14 pi (final del ensayo) en ratones Tc (círculos) y en ratones Tc+F (cuadrados). Tres experimentos independientes, N=7 ratones por grupo. $p=NS$. Los resultados se expresan como media $\pm$ error estándar.

Asimismo, el peso corporal se evaluó semanalmente y se observó que no varió considerablemente entre los ratones no infectados, infectados con *T. cruzi* e infectados y tratados con fenofibrato, ni a lo largo del tiempo que duró el experimento (Fig. 2).

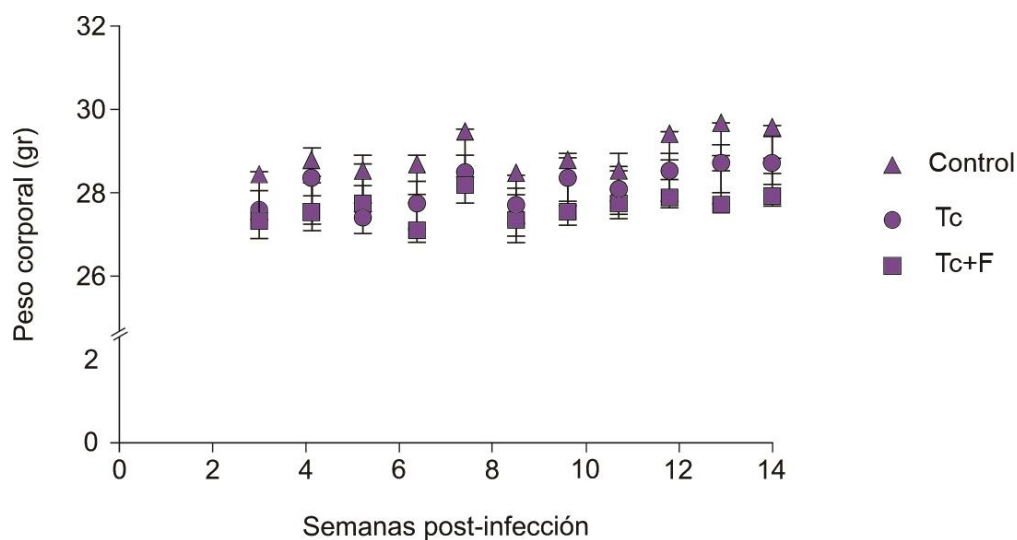


Fig. 2: Determinación de peso corporal. Semanalmente, desde la semana 3 hasta el final del ensayo. Se registró el peso corporal de ratones Control (Triángulos), Tc (Círculos) y ratones Tc+F (Cuadrados). Tres experimentos independientes, N=7 ratones por grupo. $p=NS$. Los resultados se expresan como media $\pm$ error estándar.

1.1.2. Evaluación ecocardiográfica

Con el objeto de conocer el estado de la función cardíaca en los ratones infectados, se realizaron estudios ecocardiográficos, utilizando Eco-Dopler. En la semana 10 pi se evaluaron la Fracción de Eyección (FE) y la Fracción de Acortamiento (FA), dos parámetros de función ventricular que se utilizan como estimadores de la contractilidad miocárdica. Al igual que lo reportado por Cevey 2017, pudimos comprobar que los valores de FE y FA disminuyeron en ratones infectados respecto a los valores de ambos parámetros en ratones control, indicando disfunción ventricular por la infección con *T. cruzi* (Fig. 3).

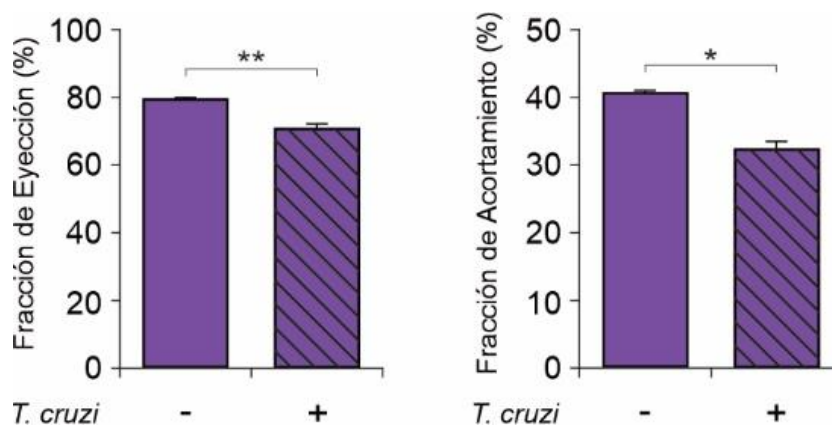


Fig. 3: Estudios ecocardiográficos de la función ventricular a las 10 spi. La fracción de eyección y la fracción de acortamiento se evaluaron mediante ecocardiografía en ratones Control (barra lisa) y ratones infectados (barra rayada) a las 10 semanas pi. Tres experimentos independientes, N=7 ratones por grupo. * $p<0,05$; ** $p<0,01$. Los resultados se expresan como media $\pm$ error estándar.

En base a este resultado y con el objetivo de corroborar el papel de fenofibrato sobre esta disfunción, se inició el tratamiento utilizando una dosis diaria de 100 mg/kg de fenofibrato por 4 semanas.

Al finalizar el tratamiento, en la semana 14 pi, nuevamente se realizaron los registros ecocardiográficos. El tratamiento con fenofibrato, en los ratones infectados, fue capaz de restaurar los valores de FE y FA a valores normales (Fig. 4). Por lo tanto, restablece la función ventricular.

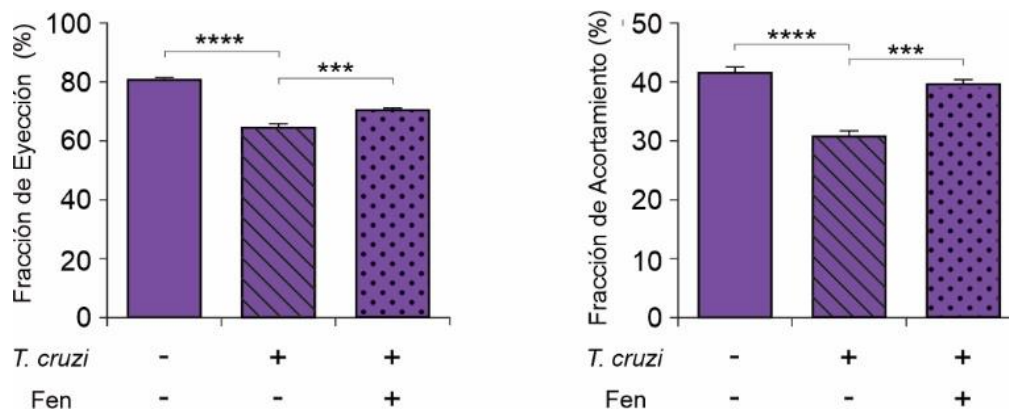


Fig. 4: Estudios ecocardiográficos de la función ventricular a las 14 semanas post-infección. La fracción de eyección y la fracción de acortamiento se evaluaron mediante ecocardiografía en ratones Control (barra lisa), ratones infectados con Tc (barra rayada) y ratones infectados (barra con puntos) y tratados en la semana 14 pi. Tres experimentos independientes, N=7 ratones por grupo. *** $p < 0,001$; **** $p < 0,0001$. Los resultados se expresan como media $\pm$ error estándar.

1.1.3. Evaluación del infiltrado inflamatorio en tejido cardíaco

A fin de evaluar la presencia de infiltrado inflamatorio en tejido cardíaco estudiamos secciones histológicas de corazón teñidas con hematoxilina eosina en los distintos grupos experimentales. A las 14 spi observamos la presencia de infiltrados inflamatorios difusos en ratones infectados, en tanto que en aquellos ratones infectados que recibieron el tratamiento se observó que fenofibrato logró disminuir significativamente el grado de infiltrado inflamatorio (Fig. 5).

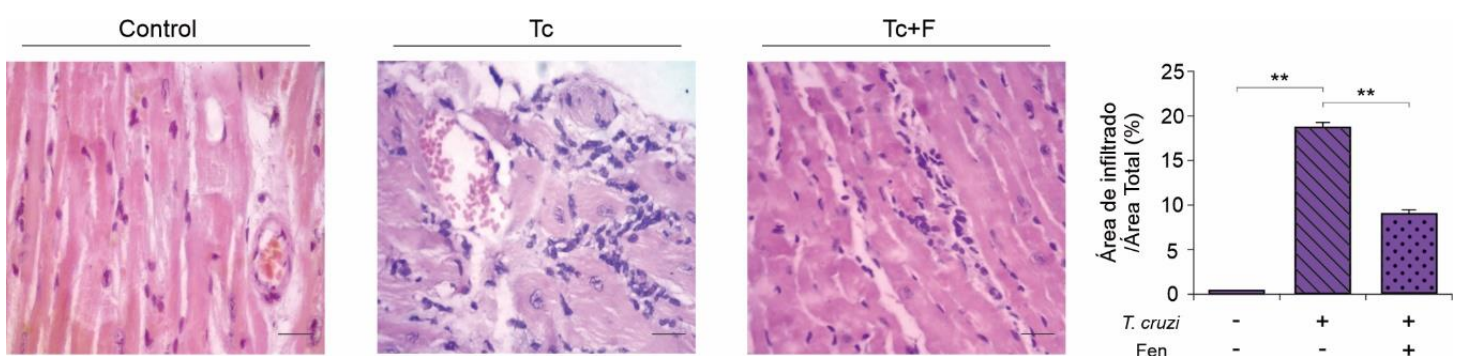


Fig. 5: Análisis de la respuesta inflamatoria en tejido cardíaco. Se analizó el efecto del tratamiento con fenofibrato sobre la respuesta inflamatoria en secciones histológicas de corazón de ratones Control (barra lisa), Tc (barra rayada) y Tc+F (barra con puntos). Magnificación 400x. Tres experimentos independientes, N=7 ratones por grupo. ** $p < 0,01$. Los resultados se expresan como media $\pm$ error estándar.

1.1.4. Expresión de mediadores pro-inflamatorios

Durante la infección se genera un microambiente de perfil inflamatorio debido a la presencia de infiltrado celular y la consecuente producción y liberación de mediadores inflamatorios en el tejido cardíaco. Para evaluar los mediadores predominantes en este perfil, estudiamos su expresión mediante las técnicas de qRT-PCR y *Western Blot*.

Entre ellos evaluamos la expresión de NOS2, enzima que destaca por su expresión en procesos inflamatorios, y TNF α como citoquina típicamente inflamatoria. Los niveles de ARNm de dichos mediadores se evaluaron en homogenatos de corazón de ratones sin infectar, infectados e infectados y tratados, utilizando la técnica de qRT-PCR. Observamos que la infección aumentó significativamente la expresión del ARNm de ambos mediadores. El tratamiento con fenofibrato logró inhibir tanto el aumento de NOS2 como el de TNF α (Fig.6).

En razón de que durante la infección con *T. cruzi* ocurren eventos de remodelación cardíaca se investigó el nivel de expresión de MMP9, una metaloproteasa de la matriz (MMP) involucrada en dichos procesos. El nivel de expresión de MMP9 fue evaluado en extractos proteicos de corazón de ratones control, infectados e infectados y tratados, mediante Western Blot. Se observó el mismo comportamiento que para los dos mediadores previamente mencionados, la infección aumentó la expresión de MMP9 y el tratamiento con fenofibrato la inhibió (Fig.7).

Estos resultados concuerdan con los reportados por Cevey en 2017.

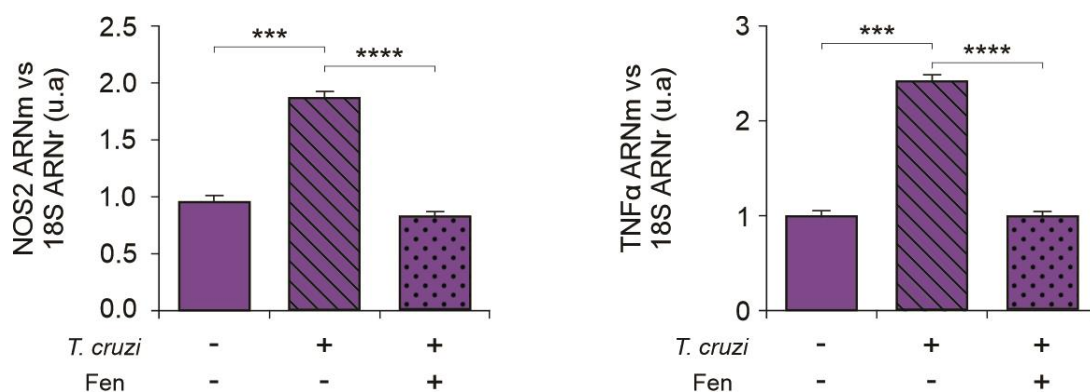


Fig. 6: Expresión de mediadores pro-inflamatorios en tejido cardíaco. Los niveles de ARNm de NOS2 y de TNF α fueron determinados en homogenatos de corazón mediante qRT-PCR de ratones Control (barra lisa), Tc (barra rayada) y Tc+F (barras con puntos). Tres experimentos independientes, N=7 ratones por grupo. *** p<0,001; ****<0,0001. Los resultados se expresan como media $\pm$ error estándar.

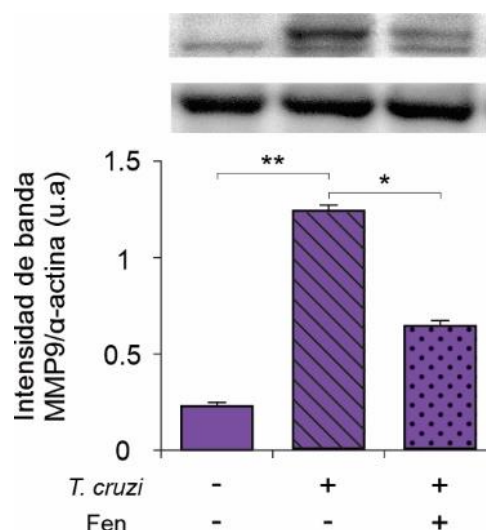


Fig. 7: Expresión de MMP9 en tejido cardíaco. La expresión de MMP9 fue estudiada en extractos proteicos de corazón mediante Western Blot, de ratones Control (barra lisa), Tc (barra rayada) y Tc+F (barra con puntos). Tres experimentos independientes, N=7 ratones por grupo (grupo control, grupo Tc y grupo Tc+F). * $p < 0,05$ ** $p < 0,01$. Los resultados se expresan como media $\pm$ error estándar.

En resumen, los resultados de las evaluaciones del peso corporal, parasitemia, estudios ecocardiográficos, estudios histológicos y de la expresión de los mediadores pro-inflamatorios confirman las características inflamatorias y disfuncionales de este modelo de infección mixta que coinciden con los resultados reportados por Cevey et al. 2017 y sientan las bases para el desarrollo del trabajo de esta tesis.

1.2. Efecto del tratamiento con fenofibrato sobre el balance Treg/Th17.

Las características típicamente inflamatorias del modelo de infección mixta y la capacidad del fenofibrato para modular la respuesta inflamatoria y prevenir la disfunción cardíaca nos llevó a preguntarnos cual es el mecanismo por el cual el fenofibrato es capaz de ejercer su efecto anti-inflamatorio en el contexto de la infección con dos cepas de distinta virulencia de *T. cruzi*.

En este sentido, se ha reportado que existe un balance entre las poblaciones linfoides Treg y Th17 que depende del microambiente que se genere en un determinado compartimento del cuerpo ya sea en una situación de homeostasis o por la perturbación de la misma como consecuencia de una respuesta inflamatoria (Weaver et al. 2009; Dutra et al. 2014). Por ello, nos preguntamos de qué manera se ve afectado ese balance en nuestro modelo de infección mixta con las dos cepas *T. cruzi*, y si el tratamiento con fenofibrato es capaz de modular alguna de estas poblaciones linfocitarias.

1.2.1. Distintos abordajes experimentales en el estudio de la población linfocitaria Treg en bazo y los efectos del tratamiento con fenofibrato.

Con el objetivo de establecer la frecuencia de la población de células Treg durante la infección y a su vez evaluar si fenofibrato ejerce algún efecto sobre esta población celular, realizamos estudios de citometría de flujo aplicando distintos abordajes metodológicos.

Para los 3 abordajes metodológicos se utilizaron suspensiones de esplenocitos totales *ex vivo* provenientes de ratones control (sin infectar), ratones infectados con *T. cruzi* y ratones infectados con *T. cruzi* y tratados con fenofibrato, que fueron sometidas a distintas condiciones experimentales que se describen a continuación.

En el primer abordaje, estudiamos la frecuencia de las células Treg en una suspensión de esplenocitos *ex vivo*, utilizando anticuerpos conjugados con FITC para marcar CD4, PE para CD25, PE/Cy7 para CD39 y APC para FOXP3, para identificar a la población linfocitaria. Se eligieron estos marcadores para identificar a la población Treg: CD4 y CD25 son proteínas de superficie de las células T involucradas en la activación de linfocitos; CD39 es una enzima localizada en la superficie de las células Treg que cataliza la hidrólisis de ATP extracelular (un patrón molecular asociado a daño, DAMP) a cAMP, en conjunto con CD73; FOXP3 es el factor de transcripción maestro que caracteriza al linaje de células T reguladoras. Observamos que el porcentaje de las células Treg no se modificaba ni con la infección, ni con el tratamiento con fenofibrato (Fig. 8).

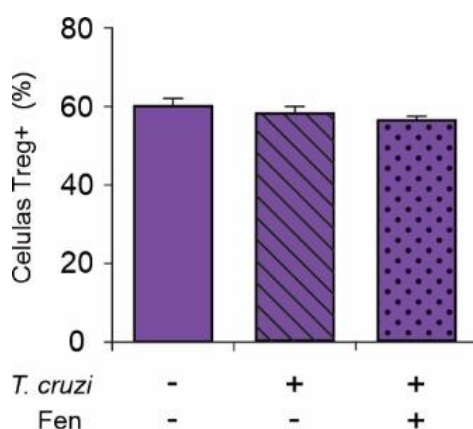


Fig. 8: Determinación del porcentaje de células Treg en bazo. La determinación del porcentaje celular de Treg fue estudiada mediante citometría de flujo en suspensiones de esplenocitos totales *ex vivo* de ratones Control (barra lisa), Tc (barra rayada) y Tc+F (barra con puntos). Tres experimentos independientes, N=7 ratones por grupo. p=NS. Los resultados se expresan como media $\pm$ error estándar.

En base a este resultado, decidimos realizar un segundo abordaje metodológico, en el cual se estimuló a la suspensión de esplenocitos con PMA e Ionomicina por 72 hs. Dicha estimulación

podría resultar en una mayor diferenciación y expansión de la población de células Treg. Bajo estas condiciones, ni la infección, ni el tratamiento con fenofibrato fueron capaces de regular la frecuencia de las células Treg (Fig.9).

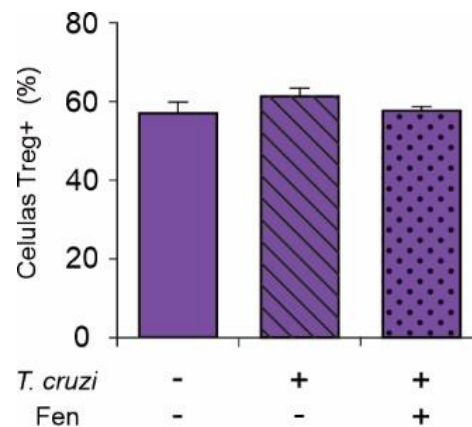


Fig. 9: Determinación del porcentaje de células Treg en suspensiones de esplenocitos totales estimulados con PMA e Ionomicina. Mediante citometría de flujo, se determinó el porcentaje de la población linfocitaria Treg en suspensiones de esplenocitos totales cultivados por 72 hs con PMA e Ionomicina de ratones Control (barra lisa), Tc (barra rayada) y Tc+F (barra con puntos). Tres experimentos independientes, N=7 ratones por grupo. p=NS. Los resultados se expresan como media $\pm$ error estándar.

Dado que con los esquemas experimentales previamente descritos no observamos cambios en la frecuencia de los linfocitos T reguladores, decidimos estudiar a esta población celular con un tercer abordaje metodológico, que consistió en obtener las suspensiones de esplenocitos y estimularlas por 96 hs con Anti-CD3, Anti-CD28, TGF β e IL-2 para emular las condiciones propicias para la diferenciación de linfocitos T hacia el fenotipo Treg.

Observamos que ni la infección, ni el tratamiento con fenofibrato fueron capaces de modificar la frecuencia de las células Treg en estas condiciones (Fig. 10).

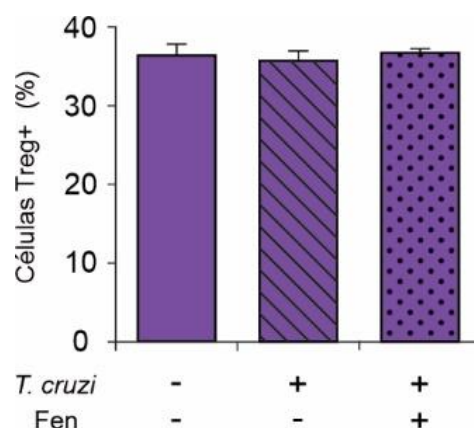


Fig. 10: Determinación del porcentaje de la población Treg en suspensiones de esplenocitos totales cultivadas con AntiCD3, AntiCD28, IL-2 y TGF β . El porcentaje de células Treg presente en suspensiones de esplenocitos totales cultivados por 96 hs con AntiCD3, AntiCD28, IL-2 y TGF β de ratones Control (barra lisa), Tc (barra rayada) y Tc+F (barra con puntos) fue analizado mediante citometría de flujo. Tres experimentos independientes, N=7 ratones por grupo. p=NS. Los resultados se expresan como media $\pm$ error estándar.

Los resultados obtenidos en los tres abordajes indican que fenofibrato no es capaz de inducir la expresión de FOXP3.

1.2.2. Estudio de la expresión de FOXP3, ROR γ t, TGF β , IL-6 e IL-2 en bazo y efectos de fenofibrato.

Para profundizar en el estudio del balance de Treg/Th17 y su modificación por fenofibrato, decidimos determinar en el bazo la expresión de otros marcadores que contribuyen a definir dichos perfiles celulares. Nos pareció de interés analizar el modelo de infección mixta, las consecuencias de la infección y el microambiente que se genera en el bazo y cómo influye sobre la diferenciación de las células linfoides, así como la capacidad del fenofibrato de regular este proceso.

En primera instancia, evaluamos la expresión de ARNm de TGF β , IL-6 e IL-2 en homogenato de bazo mediante qRT-PCR. Observamos que la infección aumentó TGF β e IL-6 y fenofibrato inhibió el aumento de expresión de ambos mediadores (Fig. 11). En cuanto a IL-2 observamos que la infección aumentó la expresión, pero el tratamiento no la modificó (Fig. 11).

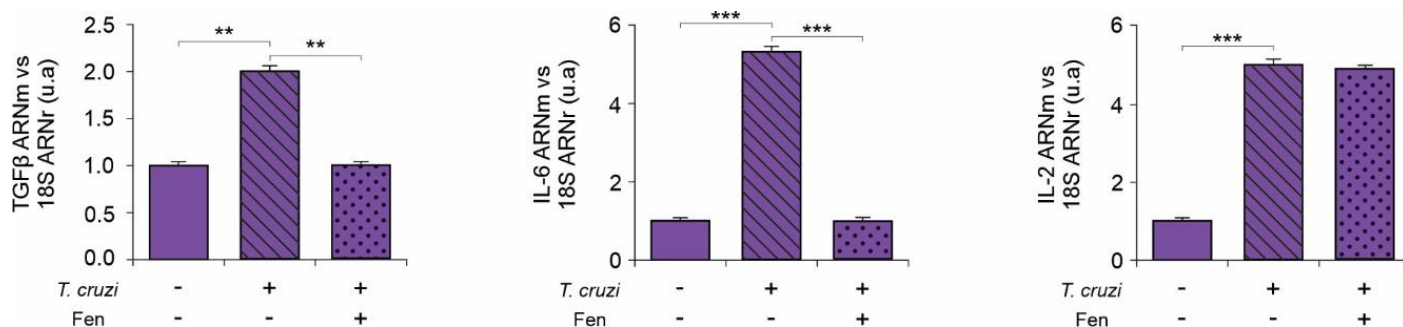


Fig. 11: Determinación de ARNm de TGFβ, IL-6 e IL-2 en bazo. La expresión de ARNm de TGFβ, IL-6 e IL-2 se evaluó mediante qRT-PCR en homogenatos de bazo de ratones Control (barra lisa), Infectados (barra rayada) e Infectados y Tratados (barra con puntos). Tres experimentos independientes, N=7 ratones por grupo. **p<0,01 *** p<0,001. Los resultados se expresan como media ± error estándar.

Dado que FOXP3 y RORγt son factores de transcripción que caracterizan y determinan el programa celular de Treg y de los linfocitos Th17, respectivamente, decidimos estudiar el nivel de expresión de estos factores en nuestro modelo. El desarrollo de ambos tipos de linfocitos T está solapado y la diferenciación hacia uno u otro dependerá del microambiente que se genere durante la injuria (Weaver et al. 2009; Cheng et al. 2016).

Con el objetivo de determinar la expresión de los factores de transcripción FOXP3 y RORγt se realizaron ensayos de qRT-PCR en homogenatos de bazo. Determinamos que la expresión de FOXP3 no se modificó ni con la infección ni con el tratamiento (al igual que lo observado en los ensayos de citometría de flujo). Sin embargo, la infección con *T. cruzi* aumentó la expresión de RORγt significativamente, y el tratamiento con fenofibrato la inhibió (Fig. 12).

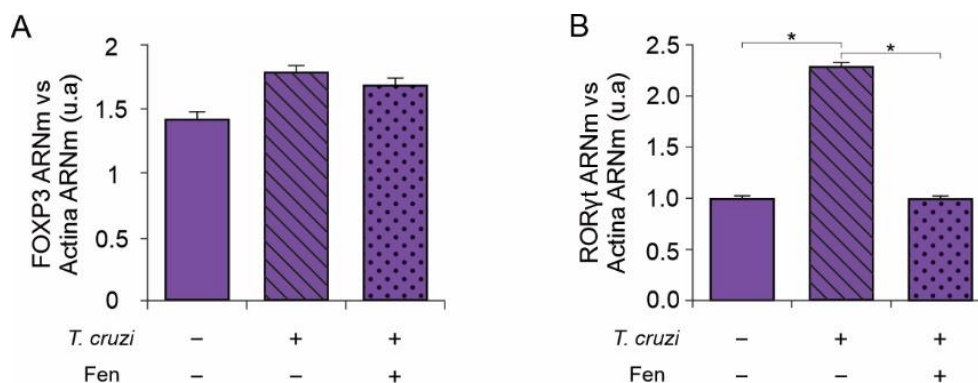


Fig. 12: Determinación del nivel de expresión de ARNm de FOXP3 y RORγt en bazo. Se evaluó la expresión de FOXP3 y RORγt en homogenatos de bazo mediante qRT-PCR en ratones Control (barra lisa), Tc (barra rayada) y Tc+F (barra con puntos). Tres experimentos independientes, N=7 ratones por grupo. *p<0,05. Los resultados se expresan como media ± error estándar.

Estos resultados nos indican que, durante la infección, se genera un microambiente que favorece la expresión de marcadores de células Th17 y que el tratamiento con fenofibrato logra disminuir dicha expresión. Sin embargo, el perfil Treg no se modifica ni con la infección, ni con el tratamiento con fenofibrato.

1.2.3. Estudio de la expresión de *TGFβ*, *IL-6*, *IL-2*, *FOXP3* y *RORγt* en tejido cardíaco

En base a los resultados previamente descriptos, nos preguntamos cual es el nivel de expresión de *TGFβ*, *IL-6* e *IL-2* en tejido cardíaco y si dicha expresión se modifica con la infección y/o el tratamiento con fenofibrato.

Para ello, evaluamos mediante qRT-PCR el nivel de expresión de ARNm de los tres mediadores celulares. El nivel de expresión del ARNm de *TGFβ* aumentó en el corazón de ratones infectados y el tratamiento con fenofibrato inhibió dicho aumento. Al igual que *TGFβ*, *IL-6* aumentó como consecuencia de la infección y fenofibrato inhibió este aumento de expresión (Fig. 13).

En cuanto a la expresión de *IL-2* observamos que la infección indujo un aumento de la expresión del ARNm en el corazón de ratones infectados, y el tratamiento con fenofibrato no modificó la expresión de esta interleuquina (Fig. 13).

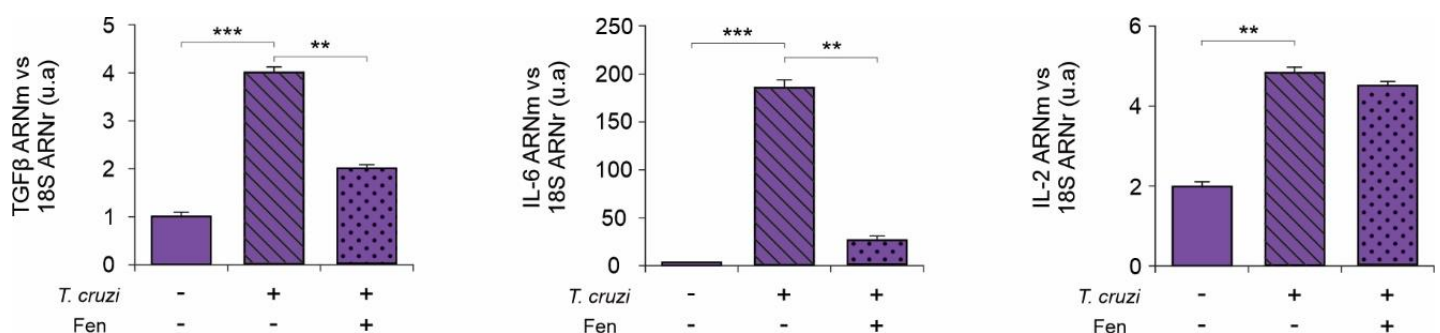


Fig. 13: Determinación del nivel de expresión de ARNm de *TGFβ*, *IL-6* e *IL-2* en tejido cardíaco. Mediante qRT-PCR se evaluó la expresión de *TGFβ*, *IL-6* e *IL-2* en homogenatos de corazón de ratones Control (barra lisa), Tc (barra rayada) y Tc+F (barra con puntos). Tres experimentos independientes, N=7 ratones por grupo. ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$. Los resultados se expresan como media $\pm$ error estándar.

Al igual que en bazo evaluamos la expresión de *FOXP3* y *RORγt* en homogenatos de corazón, mediante la técnica de qRT-PCR. Determinamos que, ni la infección con *T. cruzi*, ni el tratamiento con fenofibrato, modificaron la expresión de *FOXP3*. En cambio, la infección indujo un aumento de expresión de *RORγt* en corazón y el tratamiento con fenofibrato logró inhibirlo (Fig. 14).

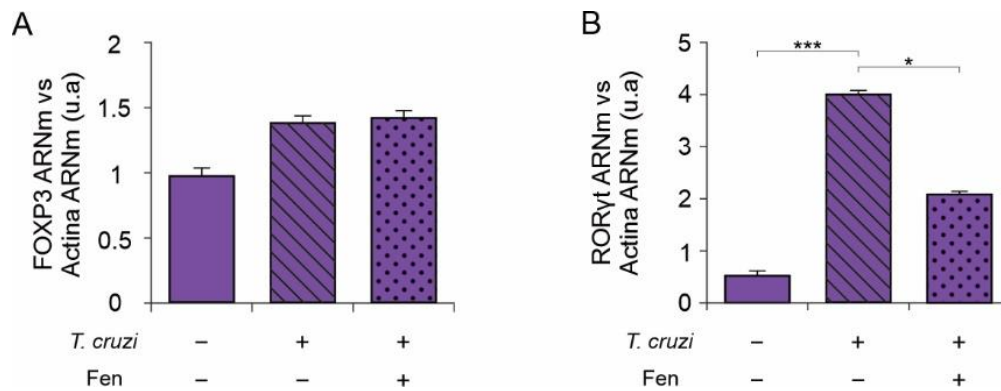


Fig. 14: Evaluación del nivel de expresión de ARNm de FOXP3 y RORyt en tejido cardíaco. La expresión de ARNm de FOXP3 y RORyt se estudió mediante qRT-PCR en homogenatos de corazón de ratones Control (barra lisa), Tc (barra rayada) y Tc+F (barra con puntos). Tres experimentos independientes, N=7 ratones por grupo. * $p<0,05$ *** $p<0,001$. Los resultados se expresan como media $\pm$ error estándar.

1.2.4. Estudio de la concentración sistémica de IL-17

Dado que el microambiente en el tejido cardíaco se caracterizó por un aumento de TGF β y de RORyt, nos pareció pertinente evaluar a nivel sistémico la concentración de IL-17, ya que es la principal interleuquina que sintetizan las células con perfil Th17. Para ello, se cuantificó IL-17 mediante ELISA en el suero de ratones de los distintos grupos experimentales. Observamos que la infección indujo aumento de la concentración de dicha citoquina y el tratamiento con fenofibrato la inhibió de forma significativa (Fig. 15).

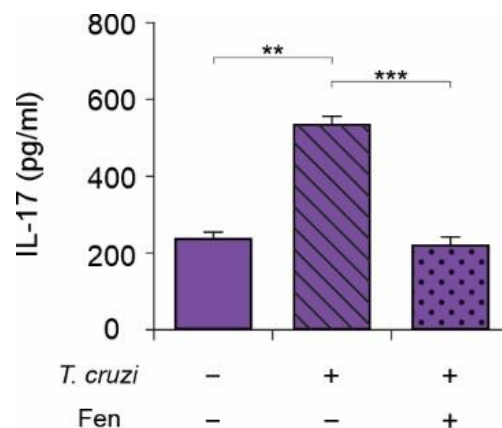


Fig. 15: Determinación de la concentración de IL-17 en suero de ratón. La concentración de IL-17 en suero se determinó mediante ELISA, en suero de ratones Control (barra lisa), Infectados (barra rayada) e Infectados y Tratados (barra con puntos). Tres experimentos independientes, N=7 ratones por grupo. ** $p<0,01$ *** $p<0,001$. Los resultados se expresan como media $\pm$ error estándar.

Estos resultados indican que durante la infección con *T. cruzi*, en el bazo y en el corazón se genera un microambiente de características similares. Podemos inferir, que en la etapa crónica

sintomática de la enfermedad el microambiente es propicio para la diferenciación hacia un perfil Th17, mientras que la población de las células Treg no sufre ninguna modificación. Por otra parte, si bien el tratamiento con fenofibrato logró inhibir el desarrollo de un perfil de tipo Th17, no tuvo efecto sobre la población de células Treg.

1.3 Efecto del fenofibrato sobre IL-10 y su receptor

La interleuquina 10 (IL-10) es una citoquina cuya función principal consiste en modular la respuesta inflamatoria inhibiendo la síntesis de citoquinas pro-inflamatorias, juega así un rol fundamental en la modulación de la respuesta inmune tanto a nivel fisiológico como patológico.

Con el objetivo de estudiar el efecto de fenofibrato sobre IL-10 evaluamos, en primer término, la expresión de esta citoquina y de su receptor, mediante qRT-PCR, en tejido cardíaco de ratones control, ratones infectados con *T. cruzi* y ratones infectados con *T. cruzi* y tratados con fenofibrato.

Como se puede apreciar en la Figura 16 la infección con *T. cruzi* aumentó la expresión de IL-10 y del receptor y el tratamiento con fenofibrato logró potenciar de manera significativa dicho aumento.

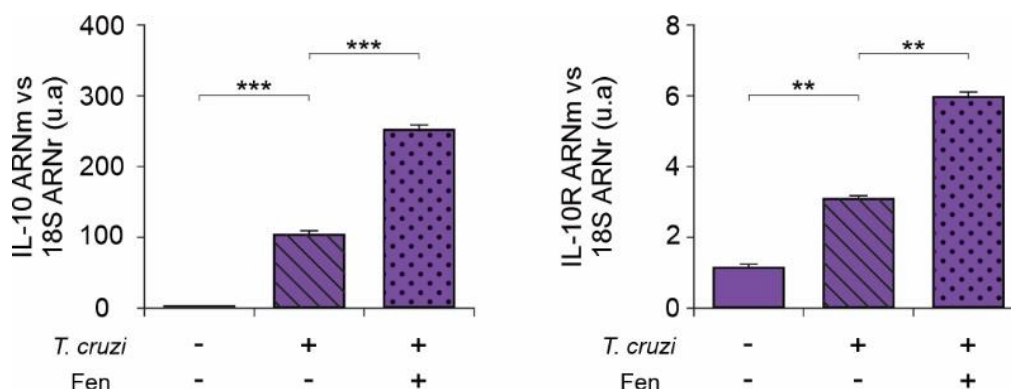


Fig. 16: Determinación del nivel de expresión de ARNm del Receptor de IL-10 e IL-10 en tejido cardíaco. El nivel de expresión de ARN mensajero de IL-10 y del receptor de IL-10 fue determinado mediante qRT-PCR en homogenatos de corazón de ratones Control (barra lisa), Infectados (barra rayada) e Infectados y Tratados (barra con puntos). Tres experimentos independientes, N=7 ratones por grupo. ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$. Los resultados se expresan como media $\pm$ error estándar.

Asimismo, estudiamos la concentración de IL-10 en el suero de ratones sin infectar, infectados e infectados y tratados con fenofibrato, mediante ELISA. La infección provocó un leve aumento de la concentración de IL-10 en suero, aunque no significativamente diferente del grupo

control. En cambio, el tratamiento con fenofibrato incrementó significativamente la concentración de IL-10 en el suero de ratones infectados (Fig. 17).

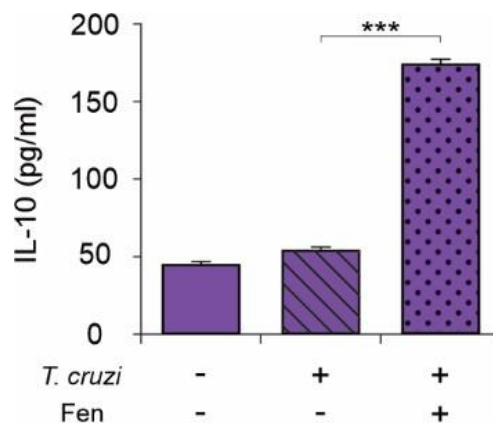


Fig. 17: Determinación de la concentración de IL-10 en suero. Se evaluó la concentración de IL-10 en suero de ratones Control (barra lisa), Tc (barra rayada) y Tc+F (barra con puntos) mediante ELISA. Tres experimentos independientes, N=7 ratones por grupo. *** $p < 0,001$. Los resultados se expresan como media $\pm$ error estándar.

1.4. Efecto del tratamiento con fenofibrato sobre la expresión de marcadores de perfil reparador.

Dado que el fenofibrato es capaz de aumentar tanto la expresión cardíaca como la concentración sérica de IL-10, nos preguntamos cual podría ser la población celular mayormente implicada en la producción de esta citoquina en nuestro modelo murino.

Durante la infección con *T. cruzi* se activan distintas poblaciones celulares, que sintetizan diversos mediadores tales como citoquinas, quemoquinas, etc. Una de las principales poblaciones celulares involucrados, en la respuesta inmune frente a la infección, son los macrófagos.

Estos fagocitos mononucleares son relevantes como células efectoras, ya que producen tanto citoquinas pro-inflamatorias (IL-6, TNF- α , entre otras) como anti-inflamatorias (IL-10) y se caracterizan por ser reclutadas al sitio de inflamación, donde ejercen mecanismos microbicidas (Shapouri-Moghaddam et al. 2018; Kadomoto et al. 2022). Nos preguntamos si estas células podrían ser una de las fuentes productoras de IL-10 en nuestro modelo murino.

Por esta razón decidimos evaluar la expresión de 3 marcadores de perfil reparador (o M2). Fizz, Ym1 y Receptor de Manosa en homogenatos de corazón de los tres grupos experimentales de ratones. Mediante qRT-PCR determinamos que la infección aumentó levemente la expresión de estos tres marcadores respecto al control y que el tratamiento con fenofibrato potenció dicho aumento de manera significativa (Fig. 18).

Estos resultados nos llevan a inferir que el fenofibrato sería capaz de promover un perfil reparador en los macrófagos, además de generar un microambiente anti-inflamatorio, para controlar el daño causado por la infección.

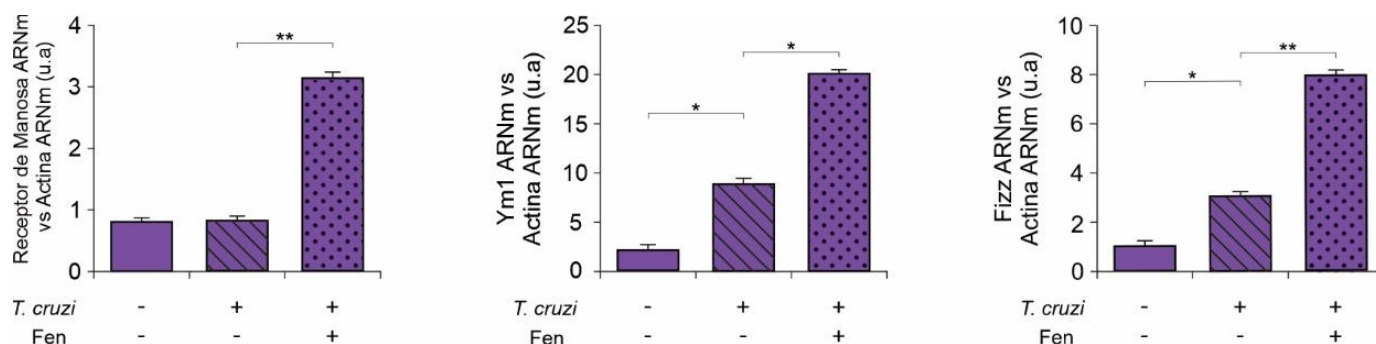


Fig. 18: Evaluación del nivel de expresión de marcadores de perfil reparador en tejido cardíaco. Se estudió la expresión de Receptor de Manosa, Ym1 y Fizz en homogenatos de corazón de ratones Control (barra lisa), Tc (barra rayada) y Tc+F (barra con puntos), a través de la técnica de qRT-PC. Tres experimentos independientes, N=7 ratones por grupo. * $p<0,05$; ** $p<0,01$. Los resultados se expresan como media $\pm$ error estándar.

CAPÍTULO 2

2. EFECTOS ANTI-INFLAMATORIOS DEL TRATAMIENTO CON FENOFIBRATO DEPENDIENTES E INDEPENDIENTES DE IL-10.

2.1. Evaluación del modelo de infección mixta en ratones IL-10 KO.

Como se mencionó previamente, IL-10 es una citoquina anti-inflamatoria con efectos pleiotrópicos sobre procesos de inmunorregulación e inflamatorios en diversas patologías.

Por estas razones, nos pareció relevante utilizar ratones knock out para IL-10, con el objetivo de estudiar el rol IL-10 en los efectos anti-inflamatorios de fenofibrato en un modelo de la enfermedad de Chagas.

Ratones WT e IL-10 KO de la cepa BALB/c, de 8 semanas de edad, fueron infectados con 1×10^5 tripomastigotes del clon K98 y re infectados 6 semanas después con 100 tripomastigotes de la cepa RA. Este esquema de infección es el explicado en el primer capítulo de esta tesis para el modelo de infección mixta, con dos cepas de *T. cruzi* de distinta virulencia.

La supervivencia de los ratones fue registrada diariamente, tanto para los ratones WT como para los IL-10 KO, frente a la infección mixta.

A partir de la semana 5 pi, pudimos constatar muertes en la población de ratones IL-10 KO. Luego de la reinfección, en la semana 6 pi, la mortalidad en el grupo de ratones IL-10 KO aumentó y en la semana 12 pi se registró el 100% de mortalidad para este grupo. Cabe señalar que el 100% de los ratones WT sobrevivió a la doble infección (Fig. 19).

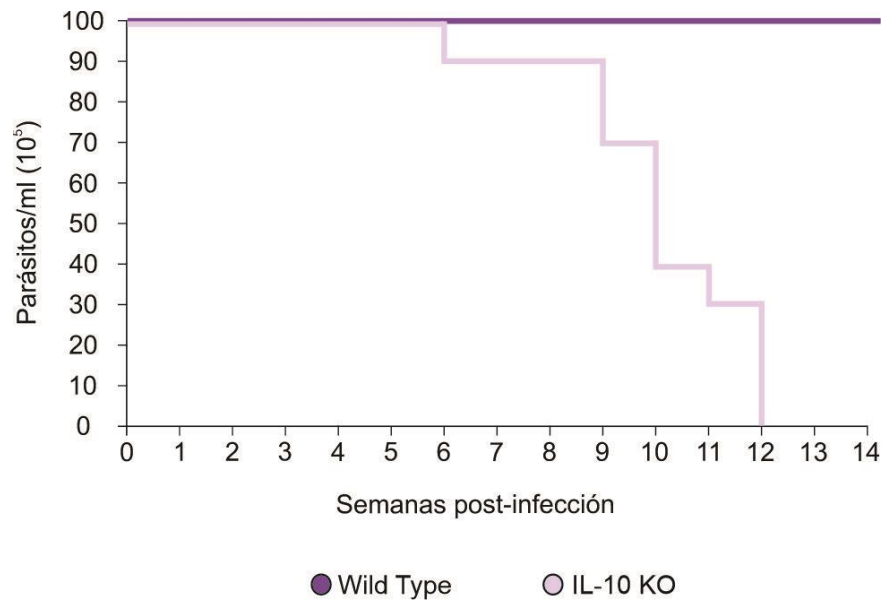


Fig. 19: Curva de supervivencia. La supervivencia se evaluó diariamente en ratones WT e IL-10 KO infectados con el clon K98 y con la cepa RA y fue analizada por el método de Kaplan Meier.

Asimismo, la parasitemia fue evaluada semanalmente y como se puede observar en la Figura 20, no hubo diferencias entre los ratones WT y los IL-10 KO a lo largo de todo el experimento. Las curvas de parasitemia presentan un aumento hasta la semana 6 pi donde se produjo el pico máximo y a partir del cual desciende la parasitemia y se mantiene en un nivel constante por el resto del experimento.

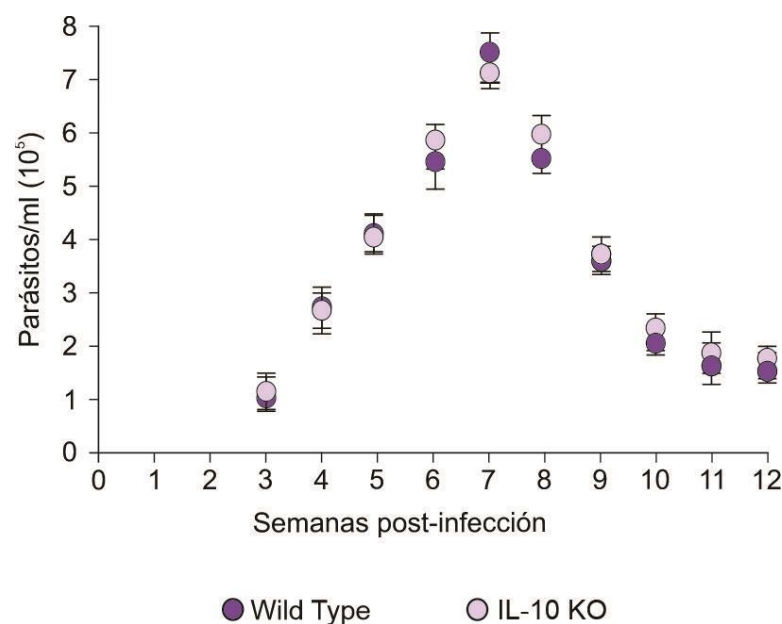


Fig. 20: Curva de parasitemia. La parasitemia se evaluó semanalmente desde por el método de Pizzi modificado por Brener en ratones WT Tc (puntos oscuros) y ratones IL-10 KO Tc (puntos claros). Tres experimentos independientes, N=7 ratones por grupo. p=NS. Los resultados se expresan como media $\pm$ error estándar.

La respuesta inmune de los ratones IL-10 KO controla la infección de manera análoga a los WT. Ante estos resultados, nos planteamos infectar a los ratones KO para IL-10 solamente con el clon K98 de la cepa CA-I.

2.2. Modelo de infección con el clon K98 de la cepa CA-I de *Trypanosoma cruzi* en ratones IL-10 KO.

2.2.1. Comportamiento frente a la infección

Ratones BALB/c WT e IL-10 KO fueron infectados con $1 \cdot 10^5$ tripomastigotes sanguíneos del clon K98.

Diariamente se evaluó su estado general (pelo hirsuto: si/no, actividad motriz: activo/pasivo) para establecer si los ratones sufrían algún tipo de deterioro y semanalmente se evaluaron el peso y la parasitemia.

La parasitemia fue detectable a la semana 2 pi por el método de microhematocrito y a partir de la semana 3 pi fue determinada mediante el método de Pizzi modificado por Brener. Se determinó a un pico máximo en la semana 6, momento a partir del cual decreció y se mantuvo constante hasta el final del experimento. La parasitemia no presentó diferencias significativas entre ratones WT y ratones IL-10 KO y tampoco entre ratones infectados y ratones infectados y tratados con fenofibrato (Fig. 21 y Fig. 22).

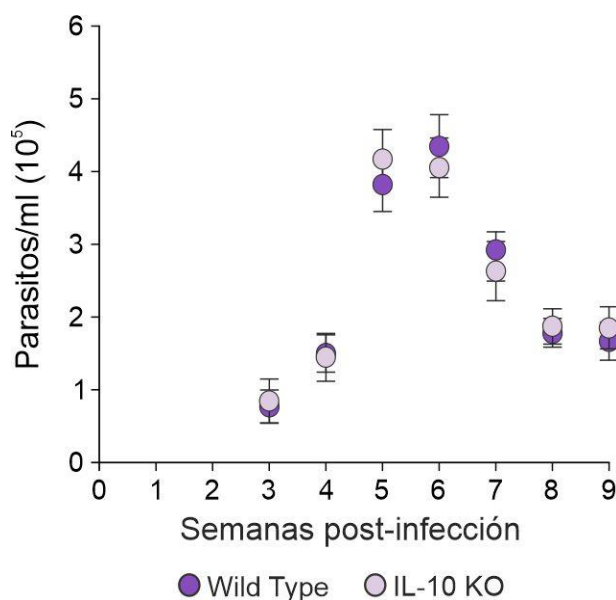


Fig. 21: Curva de parasitemia en ratones infectados. La parasitemia se evaluó semanalmente desde la semana 3 hasta la semana 9 pi en ratones WT (puntos oscuros) y ratones IL-10 KO (puntos claros) infectados con el clon K98 mediante el método de Pizzi modificado por Brener. Tres experimentos independientes, N=7 ratones por grupo. p=NS. Los resultados se expresan como media $\pm$ error estándar.

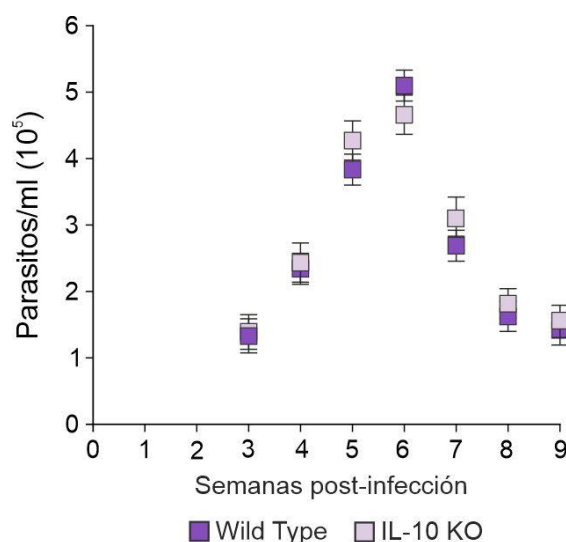


Fig. 22: Curva de parasitemia de ratones infectados y tratados con fenofibrato. Desde la semana 3 pi hasta la semana 9 pi, semanalmente se evaluó la parasitemia en ratones WT (cuadrado oscuro) y ratones IL-10 KO (cuadrados claros) infectados con el clon K98 y tratados con fenofibrato a través del método de Pizzi modificado por Brener. Tres experimentos independientes, N=7 ratones por grupo. $p=NS$. Los resultados se expresan como media $\pm$ error estándar.

2.2.2. Evaluación de la función cardíaca en ratones IL-10 KO infectados con el clon K98

En vista de que a partir de la semana 5 pi los ratones presentaron un deterioro físico al observar una disminución de su actividad motriz y pelaje hirsuto, se evaluó la función ventricular mediante estudios ecocardiográficos. Observamos que tanto la FE como la FA, estaban disminuidas significativamente en ratones IL-10 KO infectados con el clon K98 de la cepa CA-I de *T. cruzi*, respecto de los no infectados. En cambio, ninguno de los dos parámetros de función ventricular se vio afectados por la infección en los ratones WT (Fig. 23).

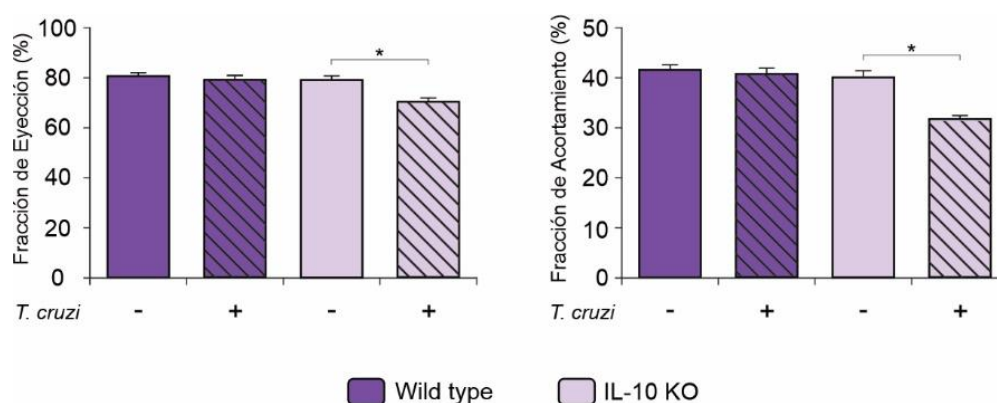


Fig. 23: Evaluación ecocardiográfica antes del inicio del tratamiento con fenofibrato. Mediante ecocardiogramas se evaluaron el porcentaje de fracción de eyección y de la fracción de acortamiento en ratones Control (barras lisas) y ratones infectados (barras rayadas), tanto WT (barras oscuras) como IL-10 KO (barras claras). Tres experimentos independientes, N=7 ratones por grupo. * $p<0,05$. Los resultados se expresan como media $\pm$ error estándar.

2.2.3. Efecto del tratamiento con fenofibrato sobre la función ventricular en ratones IL-10 KO

Dado que en la semana 5 pi los ratones IL-10 KO presentaron signos de disfunción cardíaca, nos propusimos evaluar el efecto del tratamiento con fenofibrato sobre la función ventricular, durante 4 semanas con una dosis diaria de 100 mg/kg. Al finalizar el tratamiento, en la semana 9 pi, nuevamente se evaluó la función ventricular mediante Eco Doppler. En la Figura 24, se muestra que el tratamiento con fenofibrato fue capaz de restaurar tanto la FE como la FA en ratones IL-10 KO. Los ratones WT, infectados o infectados y tratados, mantuvieron inalterados ambos parámetros.

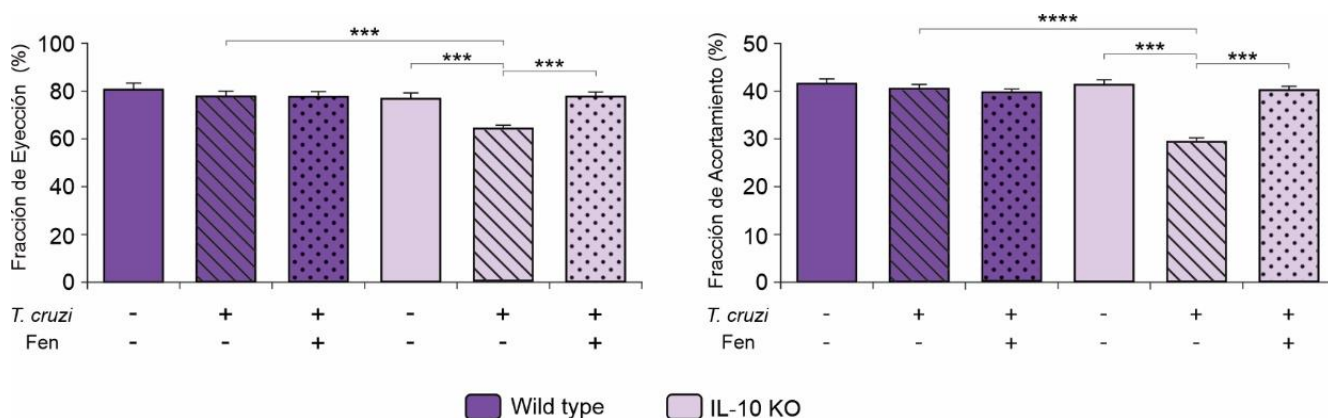


Fig. 24: Evaluación ecocardiográfica después del tratamiento con fenofibrato. La fracción de eyección y la fracción de acortamiento se determinó mediante ecocardiogramas en ratones Control WT (barra oscura lisa), Tc WT (barra oscura rayada) y Tc+F WT (barra oscura con puntos) ratones Control IL-10 KO (barra clara lisa), Tc IL-10 KO (barra clara rayada) y Tc+F IL-10 KO (barra clara con puntos). Tres experimentos independientes, N=7 ratones por grupo. ***p<0,001; **** p<0,0001. Los resultados se expresan como media $\pm$ error estándar.

2.3. Papel de fenofibrato sobre infiltrados inflamatorios en corazones de ratones IL-10 KO

Dado el antecedente de que en el modelo de infección mixta el tratamiento con fenofibrato fue capaz de disminuir el grado de infiltrado inflamatorio en tejido cardíaco, decidimos evaluar el efecto de fenofibrato sobre el infiltrado inflamatorio en el modelo de infección de ratones IL-10 KO. Para llevar a cabo esta evaluación analizamos secciones histológicas de corazón de ratones sin infectar, ratones infectados y ratones infectados y tratados con fenofibrato, teñidas con hematoxilina-eosina.

Como se puede apreciar, en el panel A de la Figura 25 los ratones IL-10 KO infectados con K98 muestran infiltrados inflamatorios intersticiales significativos, que el tratamiento con fenofibrato no fue capaz de reducir. En cambio, en los ratones WT (Figura 25 panel B) se observaron infiltrados inflamatorios muy leves, no modificados por el tratamiento con fenofibrato.

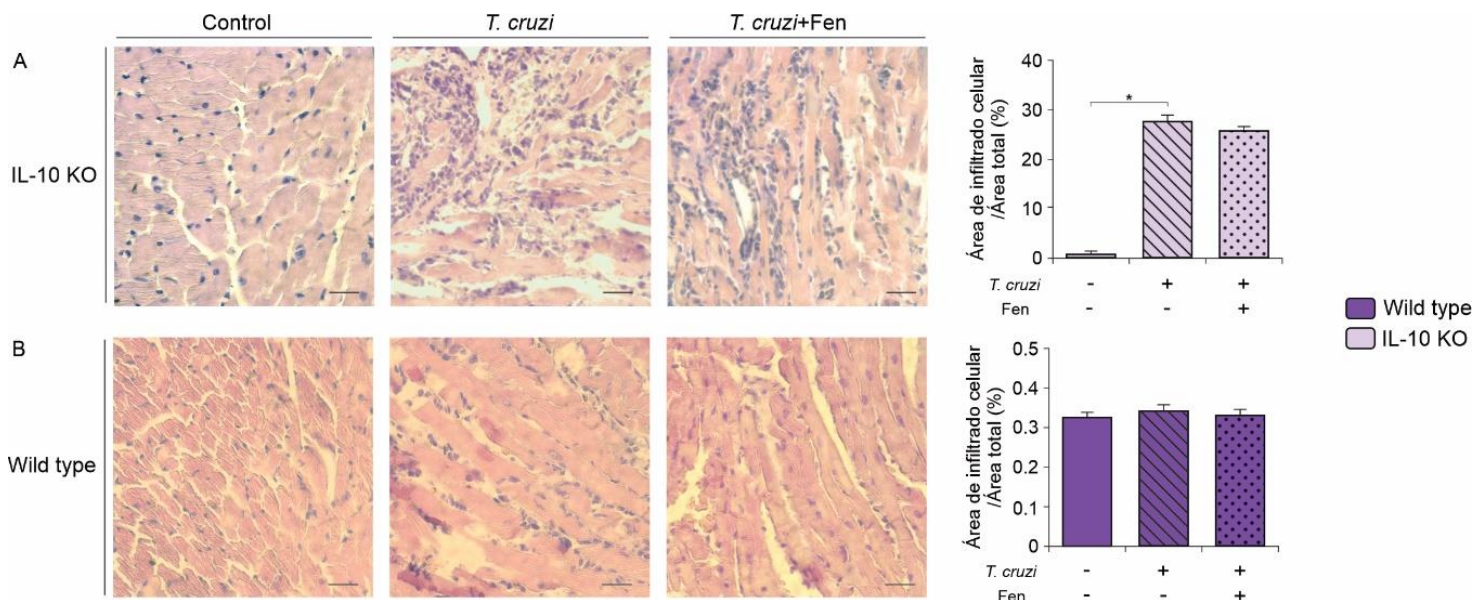


Fig. 25: Evaluación de la respuesta inflamatoria en tejido cardíaco de ratones IL-10 KO. Se evaluó la presencia de infiltrado celular en secciones histológicas de corazón de ratones Control WT (barra oscura lisa), Infectados WT (barra oscura rayada) e Infectados y Tratados WT (barra oscura con puntos), ratones Control IL-10 KO (barra clara lisa) Infectados IL-10 KO (barra clara rayada) e Infectados y Tratados IL-10 KO (barra clara con puntos). Panel A: fotos de secciones histológicas de corazón de ratones IL-10 KO control (foto izquierda), ratones IL-10 KO Tc (foto central) y ratones IL-10 KO Tc+F (foto derecha) y la cuantificación correspondiente, como gráficos de barra. Panel B: fotos de secciones histológicas de corazón de ratones WT control (foto izquierda), ratones WT Tc (foto central) y ratones WT Tc+F (foto derecha) y la cuantificación correspondiente, como gráficos de barra. Tres experimentos independientes, N=7 ratones por grupo. *p<0,05. Los resultados se expresan como media $\pm$ error estándar.

2.3.1. Actividad de Creatina Kinasa en ratones IL-10 KO

La enzima creatina quinasa se encuentra localizada mayormente en músculo esquelético y cardíaco, aunque también se ha descrito una isoforma presente en cerebro. Los cambios en la actividad sérica de CK pueden ser utilizados como un marcador bioquímico de injuria cardíaca. Nos pareció pertinente evaluar la actividad de esta enzima en el modelo de infección con K98 en ratones IL-10 KO y WT.

La actividad de CK fue determinada con un kit comercial a las 9 semanas pi. Los ratones IL-10 KO infectados presentaron un aumento significativo de la actividad enzimática en suero, respecto al grupo control. El tratamiento con fenofibrato restableció la actividad de CK a

niveles basales en ratones IL-10 KO (Fig. 26). En cambio, coincidiendo con los resultados de los estudios histológicos de infiltrados inflamatorios, se observó que la actividad de CK en ratones WT no se modificó con la infección ni con el tratamiento con fenofibrato (Fig. 26).

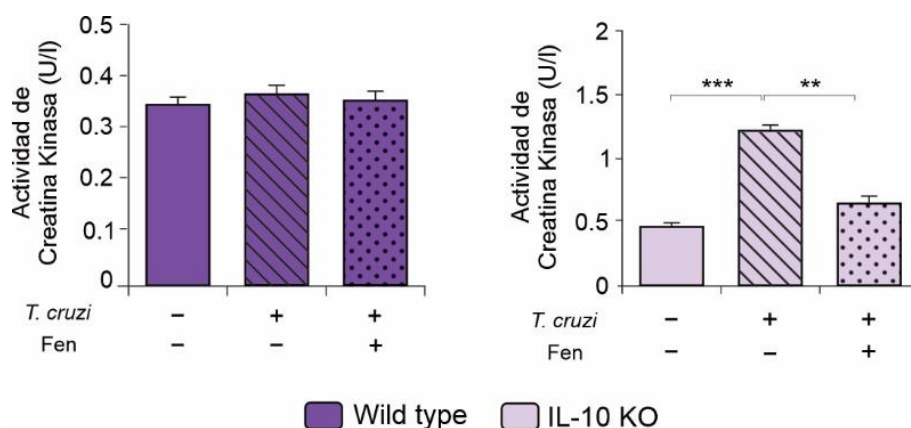


Fig. 26: Actividad de Creatina Kinasa en corazón de ratones IL-10 KO. La actividad de creatina kinasa en suero de ratones Control (barra lisa), Tc (barra rayada) y Tc+F (barra con puntos) WT (barras oscuras) e IL-10 KO (barras claras), fue determinada como un marcador de injuria cardíaca mediante la evaluación de una reacción colorimétrica. Tres experimentos independientes, N=7 ratones por grupo. **p<0,01; *** p<0,001. Los resultados se expresan como media $\pm$ error estándar.

2.4. Evaluación del efecto de fenofibrato sobre la fibrosis cardíaca

2.4.1. Relación del peso del corazón y el peso corporal

La fibrosis es una característica asociada a la remodelación progresiva, que ocurre en el tejido cardíaco durante la infección con *T. cruzi*. En el modelo de infección mixta (Cevey et al. 2017) se comprobó que el tratamiento con fenofibrato logró prevenir el grado de fibrosis cardíaca. Por ello, quisimos determinar si la IL-10 tiene algún papel, en la evolución de la fibrosis cardíaca, ante la infección con K98 de ratones IL-10 KO, y el efecto del tratamiento con fenofibrato ante la misma. Para esto, secciones histológicas de corazón fueron teñidas con rojo picrosirio. La infección con *T. cruzi* aumentó el depósito de fibras de colágeno en el tejido cardíaco y el tratamiento con fenofibrato fue capaz de reducirlo de forma significativa en ratones IL-10 KO, tal como se puede apreciar en la Figura 27 A. En cambio, observamos que los ratones WT infectados con K98 no desarrollan fibrosis cardíaca (Fig. 27 B).

Por otra parte, también se registró el peso de los corazones tanto de ratones IL-10 KO como de ratones WT. El peso de los corazones de ratones IL-10 KO infectados fue significativamente mayor que el de ratones IL-10 KO sin infectar. Asimismo, pudimos constatar que el peso del corazón de los ratones IL-10 KO infectados es significativamente mayor que en ratones WT infectados. En cuanto al efecto del tratamiento con fenofibrato, observamos que produjo una

disminución significativa del peso del corazón en ratones IL-10 KO infectados con *T. cruzi* (Fig. 27 C) y que no modifico el peso de los WT infectados y tratados. (Fig. 27 C).

No se encontraron diferencias en el peso del corazón entre los grupos experimentales de ratones WT (Fig. 27 C). Se puede inferir que el aumento del peso del corazón observado en los corazones de los ratones IL-10 KO infectados se debe a la mayor deposición de fibras de colágeno como consecuencia de la respuesta a la injuria del miocardio.

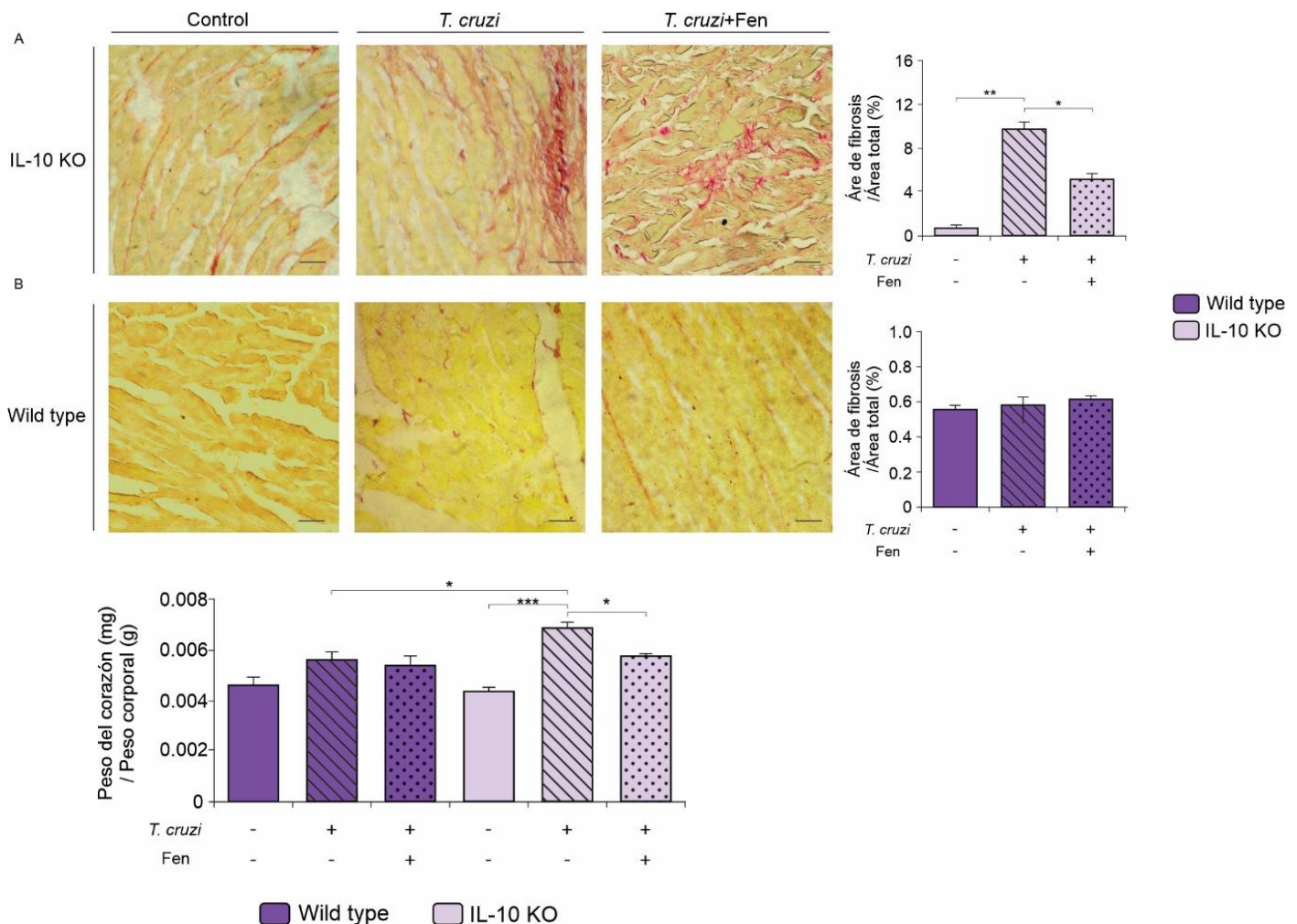


Fig. 27: Evaluación de fibrosis en ratones IL-10 KO. Se evaluó el área de fibrosis mediante la tinción con rojo picosirio de secciones histológicas de corazón. A) Secciones histológicas de corazón de ratones IL-10 KO, Control (foto izquierda), infectados (foto central) infectados y tratados (foto derecha), y la correspondiente cuantificación. B) Secciones histológicas de corazón de ratones WT Control (foto izquierda), WT Tc (foto central) WT Tc+F (foto derecha), y la correspondiente cuantificación. C) Se evaluó la relación peso del corazón respecto al peso corporal de ratones IL-10 KO (control: barra clara lisa; Tc: barra clara rayada; Tc+F: barra clara con puntos) y WT (control: barra oscura lisa; Tc: barra oscura rayada; Tc+F: barra oscura con puntos) de todos los grupos experimentales. El corazón se extrajo del cuerpo del ratón, se eliminó el exceso de sangre y se pesó. Antes de ser sacrificados los ratones fueron pesados, para obtener el valor del peso corporal. Tres experimentos independientes, N=7 ratones por grupo. *p<0,05 **; p<0,01; *** p<0,001. Los resultados se expresan como media $\pm$ error estándar.

2.4.2. Expresión de TGF β en el corazón de ratones IL-10 KO

TGF β es un factor de crecimiento que puede promover o inhibir la proliferación celular, dependiendo del contexto en el cual es estimulada su transcripción. En el caso de la infección por *T. cruzi* TGF β es considerado como un mediador profibrótico (Ferreira et al. 2019). En razón de esto y de que, en nuestros estudios, observamos un incremento del grado de fibrosis en el tejido cardíaco de ratones IL-10 KO infectados con el clon K98, decidimos evaluar la expresión de TGF β en el corazón de ratones IL-10 KO infectados con *T. cruzi*, así como el efecto del tratamiento con fenofibrato.

Al evaluar la expresión de TGF β , mediante qRT-PCR, se determinó un incremento de esta citoquina en el corazón de ratones IL-10 KO infectados. Asimismo, determinamos que el tratamiento con fenofibrato inhibió TGF β de forma significativa. Por otra parte, se observó que la expresión de TGF β no se modificó ni con la infección ni con el tratamiento en ratones WT (Fig. 28).

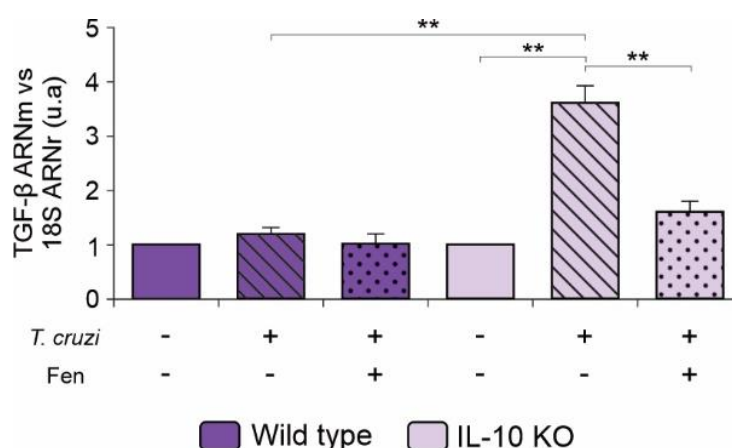


Fig. 28: Determinación del nivel de expresión de TGF β en tejido cardíaco. Se evaluó, mediante qRT-PCR, el nivel de expresión de ARNm en homogenatos de corazón en ratones Control WT (barra oscura lisa), Tc WT (barra oscura rayada) y Tc+F WT (barra oscura con puntos), ratones Control IL-10 KO (barra clara lisa), Tc IL-10 KO (barra clara rayada) y ratones Tc+F IL-10 KO (barra clara con puntos). Tres experimentos independientes, N=7 ratones por grupo. ** p<0,01. Los resultados se expresan como media $\pm$ error estándar.

2.5. Expresión de citoquinas pro-inflamatorias y efecto del tratamiento con fenofibrato

Previamente se demostró que mediadores pro-inflamatorios (NOS2, IL-6 y TNF α) aumentan su expresión en el corazón de ratones infectados con el clon K98 (cepa CA-I) y la cepa RA de *T. cruzi* y que el tratamiento con benznidazol y fenofibrato fue capaz de modular esta respuesta (Cevey et al. 2017). Para determinar si fenofibrato, en ausencia de tratamiento con benznidazol, es capaz de ejercer este mismo efecto en ratones deficientes en IL-10, evaluamos la expresión de ARNm de NOS2, IL-6 y TNF α , en tejido cardíaco, de ratones IL-10 KO infectados

con K98. Mediante qRT-PCR determinamos, que la expresión de los tres mediadores pro-inflamatorios aumentó de manera significativa en ratones IL-KO, y que esta fue inhibida por el tratamiento con fenofibrato (Fig. 29 A, B y C). Los niveles de expresión de los ARNm de NOS2, IL-6 y TNF α de ratones WT no se modificaron significativamente, ni con la infección, ni con el tratamiento con fenofibrato (Fig. 29 A, B y C).

Por otra parte, utilizando la técnica de ELISA se evaluaron las concentraciones séricas de IL-6, TNF α e IL-17. En ratones IL-10 KO infectados se observó un incremento de las concentraciones de estas tres citoquinas (Fig. 29 D, E y F) y se determinó que el tratamiento con fenofibrato inhibió dicho aumento (Fig. 29 D, E y F). Asimismo, en ratones WT la infección indujo un aumento de IL-6 que fenofibrato inhibió significativamente. La infección también aumentó levemente la concentración de TNF α y el tratamiento con fenofibrato no la modificó. En cambio, los niveles de IL-17 en los ratones WT no se modificaron de forma considerable con la infección, sin embargo, el fenofibrato redujo significativamente los niveles séricos (Fig. 29 D, E y F).

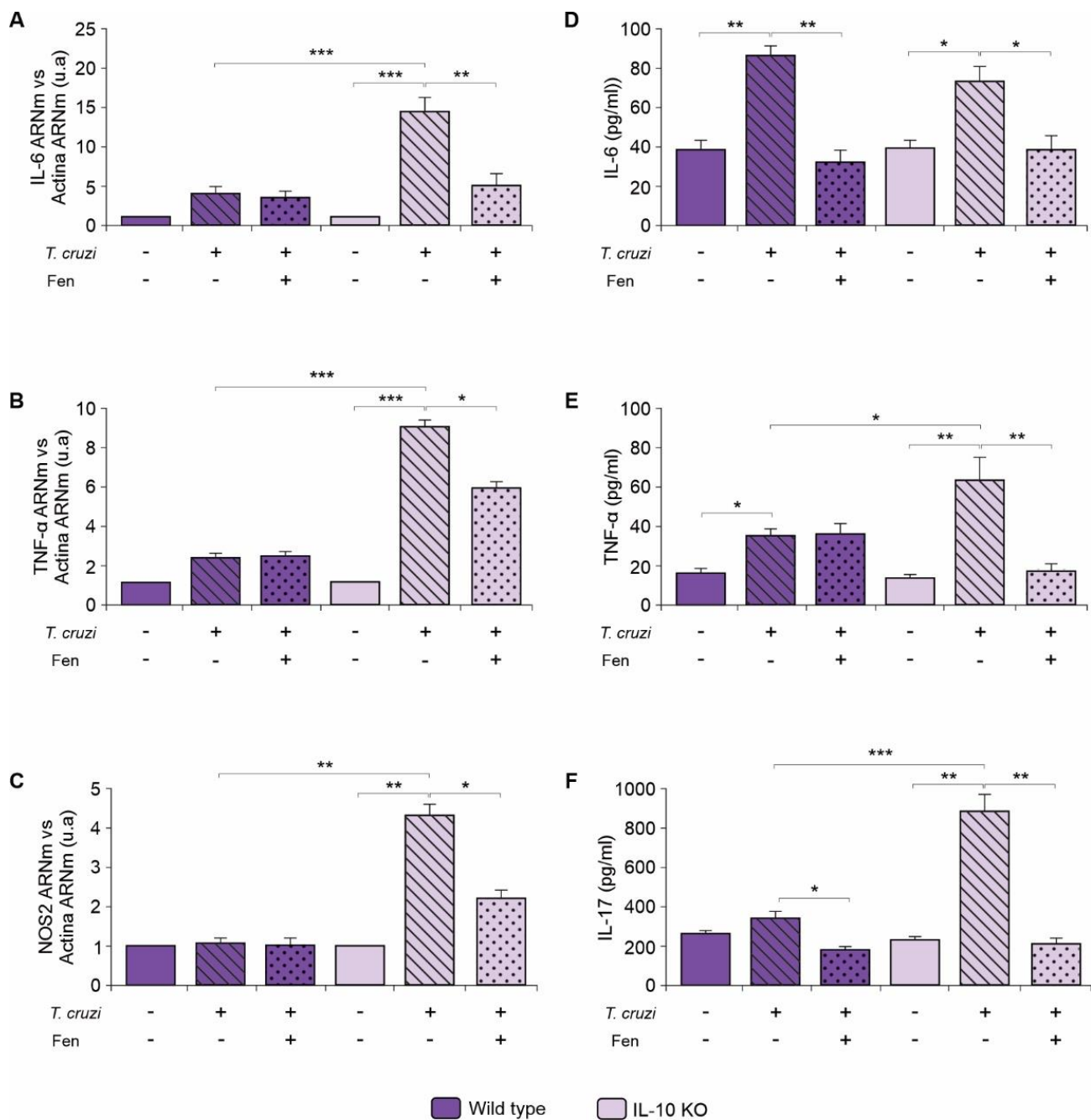


Fig. 29: Determinación de la expresión de NOS2, IL-6 y TNFα en tejido cardíaco y de la concentración de IL-6, IL-17 y TNFα en suero. El nivel de expresión de IL-6 (A), TNFα (B) y NOS2 (C) se determinó en homogenatos de corazón mediante qRT-PCR de ratones Control WT (barra oscura lisa), Tc WT (barra oscura rayada) y Tc+F WT (barra oscura con puntos), ratones Control IL-10 KO (barra clara lisa), Tc IL-10 KO (barra clara rayada) y ratones Tc+F IL-10 KO (barra clara con puntos). La concentración en suero de IL-6 (D), TNFα (E) e IL-17 (F) se evaluó mediante ELISA en los mismos grupos experimentales. Tres experimentos independientes, N=7 ratones por grupo. *p<0,05; ** p<0,01; p<0,001. Los resultados se expresan como media ± error estándar.

2.6. Relación entre mediadores pro-inflamatorios y disfunción ventricular. Efecto del tratamiento con fenofibrato

La infección con el clon K98 en ratones IL-10 KO origina disfunción ventricular y aumento de la expresión y concentración de mediadores pro-inflamatorios. Por otra parte, el tratamiento con fenofibrato inhibió la expresión y la concentración de los mediadores inflamatorios y restauró la disfunción ventricular. Teniendo en cuenta estos resultados, realizamos el análisis de correlación entre los mediadores pro-inflamatorios y la disfunción ventricular. Utilizando la prueba de Spearman observamos una fuerte correlación negativa (cercana a -1) entre la expresión del ARN mensajero de IL-6, NOS2, TNF α y TGF β en tejido cardíaco, y los porcentajes de FE y de FA (Figuras 30 y 31 y Figuras A5, A2 y A3 del anexo). También se observó correlación negativa entre la concentración de TNF α e IL-17 en suero y los porcentajes de FE y de FA (Figuras A1 y A4 del anexo). Por otra parte, de modo consistente con el hecho de que el clon K98 no generó disfunción cardíaca en ratones WT, era de esperar una correlación muy débil entre los distintos mediadores pro-inflamatorios y la FE y de FA, en este grupo experimental. Se muestran en las Figuras 30 y 31 los resultados obtenidos para la correlación entre la disfunción ventricular y la expresión de ARNm de IL-6 y la disfunción ventricular y la concentración en suero de IL-6, respectivamente. En el anexo de figuras se pueden encontrar las correlaciones correspondientes a la disfunción y NOS2, TNF α y TGF β con sus respectivos valores de R².

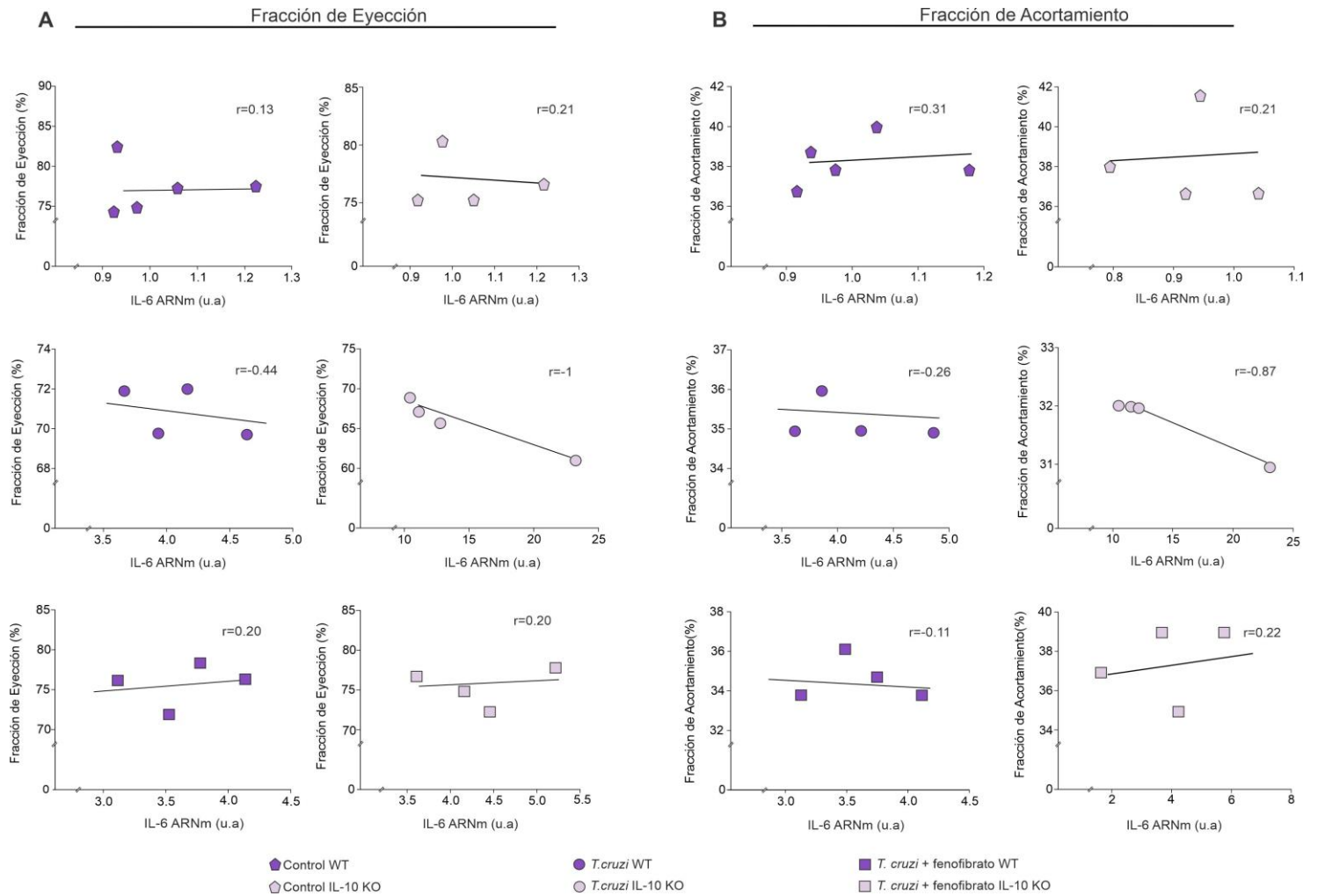


Fig. 30: Relación entre disfunción ventricular e IL-6. Mediante el test de Correlación de Spearman se determinó la relación entre la fracción de eyección (A) o fracción de acortamiento (B) y el nivel de expresión de ARNm de IL-6 en tejido cardíaco de ratones control (pentágonos, fila superior del gráfico), ratones Tc (círculos, fila intermedia del gráfico) y ratones Tc+F (fila inferior del gráfico, cuadrados), tanto WT (símbolos violeta oscuro) como IL-10 KO (símbolos violeta claro). El coeficiente de correlación está reportado para cada una de las correlaciones.

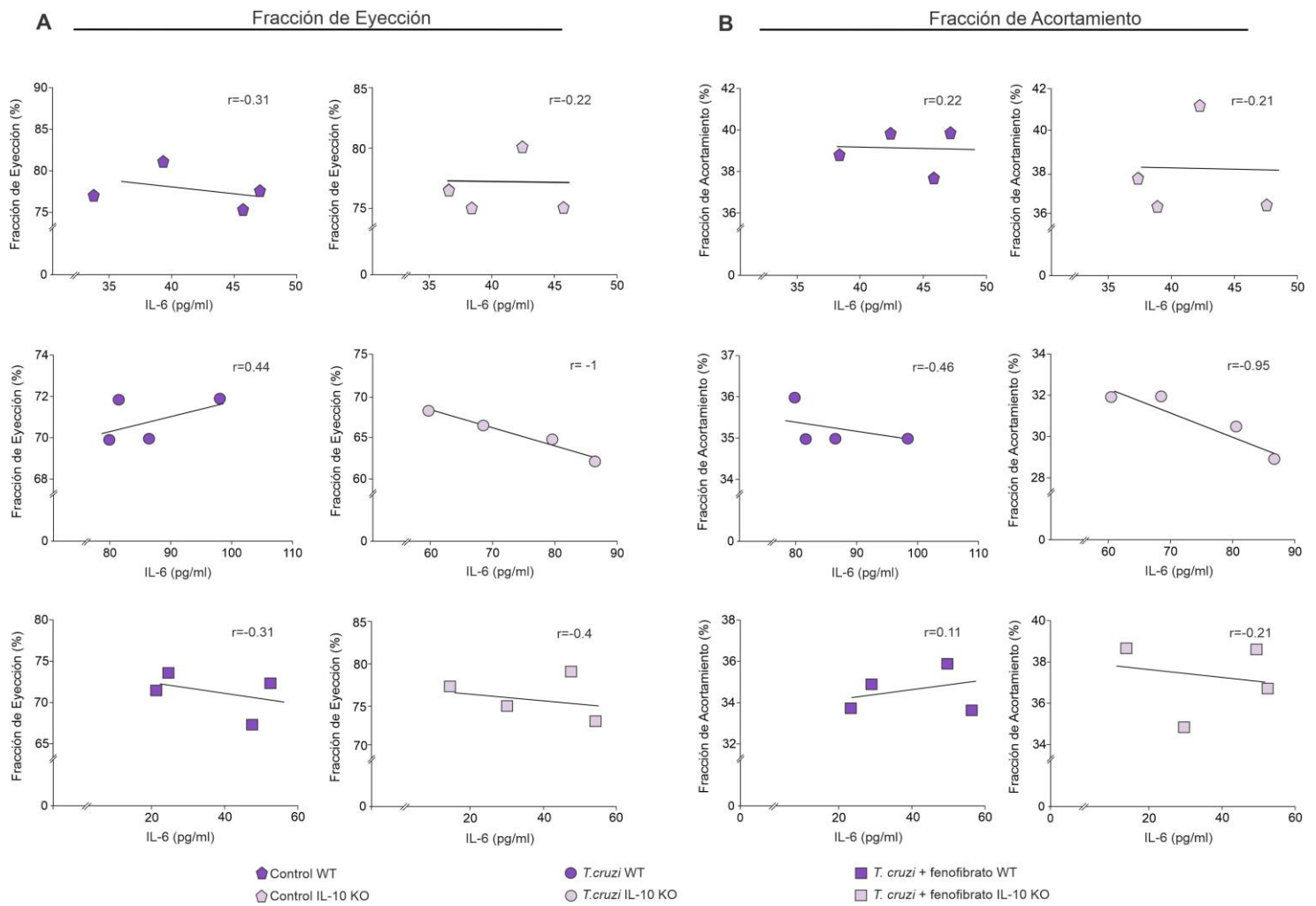


Fig. 31: Relación entre disfunción ventricular e IL-6. Mediante el test de Correlación de Spearman se determinó la relación entre la fracción de eyección (A) o fracción de acortamiento (B) y el nivel de concentración de IL-6 en suero de ratones control (pentágonos, fila superior del gráfico), ratones Tc (círculos, fila intermedia del gráfico) y ratones Tc+F (fila inferior del gráfico, cuadrados), tanto WT (símbolos violeta oscuro) como IL-10 KO (símbolos violeta claro). El coeficiente de correlación está reportado para cada una de las correlaciones.

2.7. Efecto del tratamiento con fenofibrato sobre la expresión de marcadores de perfil reparador en ratones IL-10 KO

Dado que en el modelo de infección mixta observamos que fenofibrato fue capaz de promover la expresión de marcadores de perfil reparador, surgió el interrogante de si podía ejercer este efecto en ausencia de IL-10. Para ello, se analizó la expresión de Fizz, Ym1 y Receptor de Manosa en tejido cardíaco de ratones IL-10 KO y WT. La infección con *T. cruzi* aumentó la expresión de Receptor de Manosa, Ym1 y Fizz en ratones WT y el tratamiento con fenofibrato logró potenciar este aumento (Fig. 32). En los ratones IL-10 KO la infección incrementó la expresión de Receptor de Manosa y de Ym1; sin embargo, el tratamiento con fenofibrato no fue capaz de potenciar este aumento (Fig. 32). La expresión de Fizz no se vio modificada, ni con la infección, ni con el tratamiento con fenofibrato en el tejido cardíaco de ratones IL-10 KO (Fig. 32).

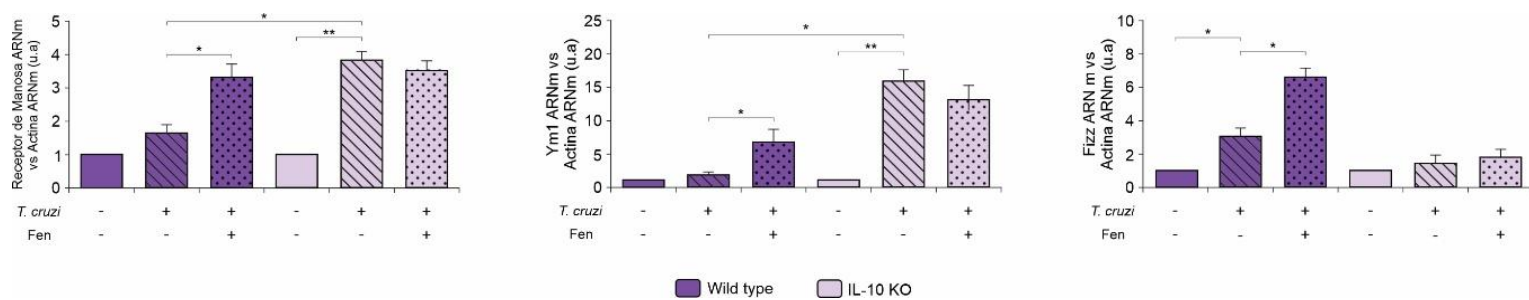


Fig. 32: determinación del nivel de expresión de ARNm de marcadores de perfil reparador. Se evaluó el nivel de expresión de ARNm de Receptor de Manosa, Ym1 y Fizz en homogenatos de corazón de ratones Control WT (barra oscura lisa), Tc WT (barra oscura rayada) Tc+F WT (barra oscura con puntos), ratones Control IL-10 KO (barra clara lisa), Tc IL-10 KO (barra clara rayada) y Tc+F IL-10 KO (barra clara con puntos). Tres experimentos independientes, N=7 ratones por grupo. *p<0,05 ** p<0,01. Los resultados se expresan como media ± error estándar.

2.8. Efecto del tratamiento con fenofibrato sobre la expresión de RORγt y FOXP3 en el corazón de ratones IL-10 KO

El balance entre RORγt y FOXP3 es importante para mantener la homeostasis inmunológica y prevenir respuestas inmunes inapropiadas. Una desregulación en este balance puede conducir a procesos inflamatorios. Por ello, nos propusimos evaluar la capacidad de fenofibrato de modular la expresión de RORγt y FOXP3 en ausencia de IL-10.

Se determinó que la expresión de RORγt aumentó significativamente a causa de la infección, tanto en ratones IL-10 KO como en ratones WT (Fig. 33 A). Asimismo, la expresión de RORγt es modulada por fenofibrato en ambos fenotipos de ratón (Fig. 33 A). En cuanto a la expresión de

FOXP3 se observó que ni la infección ni el tratamiento con fenofibrato fueron capaces de modular la expresión, tanto en ratones WT como en ratones IL-10 KO (Fig. 33 B).

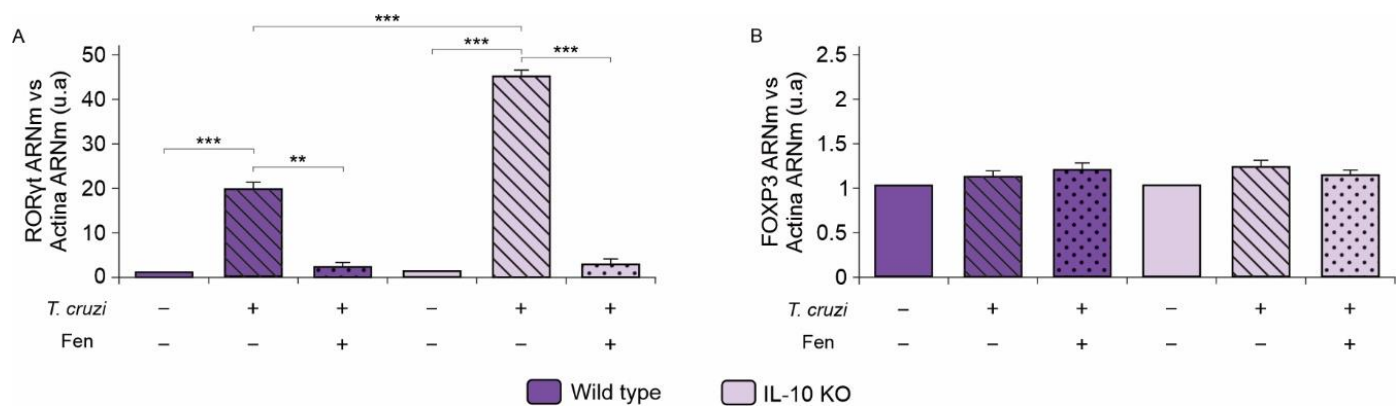


Fig. 33: Determinación del nivel de expresión de ARNm de RORyt y FOXP3 en tejido cardíaco. La expresión de ARNm de RORyt (A) y FOXP (B) se analizó mediante qRT-PCR en homogenatos de corazón de ratones Control WT (barra oscura lisa), Tc WT (barra oscura rayada) y Tc+F WT (barra oscura con puntos), ratones Control IL-10 KO (barra clara lisa), Tc IL-10 KO (barra clara rayada), Tc+F IL-10 KO (barra clara con puntos). Tres experimentos independientes, N=7 ratones por grupo. * $<0,01$; *** $p<0,001$. Los resultados se expresan como media $\pm$ error estándar.

DISCUSIÓN

La enfermedad de Chagas se caracteriza por la presencia de tripomastigotes en circulación sanguínea, parasitismo, principalmente en tejido muscular, e inflamación generalizada. La respuesta inmune desarrollada en la fase aguda de no ser regulada apropiadamente puede generar un proceso inflamatorio exacerbado y sostenido en el tiempo, que eventualmente conducirá a alteraciones cardíacas en la fase crónica, como la Cardiomiopatía Chagásica Crónica (Marin-Neto et al. 2007; Bocchi et al. 2017; Echeverria et al. 2019).

Aunque los mecanismos que conducen al desarrollo de CCC siguen siendo desconocidos, debido al hecho de que no todos los pacientes infectados desarrollan patología cardíaca, actualmente se reconoce la relevancia de la persistencia del parásito como desencadenante (Tarleton 2001; Gutierrez et al. 2009a; Chevillard et al. 2018; Wesley et al. 2019). Más aún, existe un amplio consenso sobre el origen inflamatorio de la patología chagásica y es considerada como un síndrome miocardiopático inflamatorio (Trachtenberg et al. 2017). En este sentido, se ha demostrado una mayor expresión de mediadores pro-inflamatorios en suero y tejidos, en distintos estudios de modelos experimentales de la enfermedad de Chagas (Sanoja et al. 2013; Vitelli-Avelar et al. 2017; Silva et al. 2021). Asimismo, diferentes trabajos muestran, en la fase aguda de la enfermedad, una correlación entre la concentración tisular y sistémica de mediadores inflamatorios y la pérdida de funcionalidad cardíaca en modelos murinos (Roman-Campos et al. 2009; Nisimura et al. 2023). Otros trabajos han mostrado citoquinas pro-inflamatorias elevadas en suero y muestras de secciones de corazón de pacientes con CCC, en comparación con las de pacientes con infección crónica asintomática (Cunha-Neto et al. 2014; Keating et al. 2015; González et al. 2018).

Los modelos experimentales de infección con diferentes cepas de *T. cruzi*, han sido útiles para poder estudiar el rol de los distintos mediadores involucrados en la respuesta inmune, durante las distintas etapas de la infección. En trabajos previos de nuestro grupo hemos demostrado que la infección con la cepa RA de *T. cruzi* produce una intensa respuesta inflamatoria en distintos modelos experimentales *in vitro*, como cultivos primarios de miocardiocitos (Hovsepian et al. 2011), o de macrófagos peritoneales (Penas et al. 2015), e *in vivo* en corazón (Penas et al. 2013; Cevey et al. 2017) e hígado (Penas et al. 2016). Además, demostramos también en células mononucleares de sangre periférica (PBMC: peripheral blood mononuclear cells, por sus siglas en inglés) de pacientes con enfermedad de Chagas, que presentan niveles más altos de citoquinas pro-inflamatorias que las PBMC de individuos no infectados, independientemente del estadio clínico de la enfermedad, ya sea asintomático o con cardiopatía chagásica (Pieralisi et al. 2022). También hemos demostrado que un ligando natural de PPAR γ , la 15-deoxi-prostaglandina-J2 (15dPGJ2) fue capaz de modular la respuesta inflamatoria en células cardíacas estimuladas con LPS (Hovsepian et al. 2010), en

miocardiocitos infectados con *T. cruzi* (Hovsepian et al. 2011) y en un modelo murino de infección con *T. cruzi* (Penas et al. 2013).

En este sentido, el empleo de fármacos que reduzcan dicha inflamación podría ser una posible estrategia terapéutica coadyuvante al tratamiento antiparasitario, por lo que su estudio resulta relevante.

Se ha reportado que fenofibrato, ligando sintético de PPAR α , tiene efectos anti-inflamatorios en modelos murinos de enfermedades inflamatorias como esclerosis múltiple (Abulaban et al. 2024), enfermedad inflamatoria intestinal (Lee et al. 2007), artritis (Castillero et al. 2011) entre otras. Más aún, se ha demostrado efectos cardioprotectivos de fenofibrato en modelos de miocarditis autoinmune (Cheng et al. 2016), de inflamación del músculo esquelético (Dai et al. 2016) y en modelos de isquemia/ reperusión cardíaca (Bukari 2018; Balakumar et al. 2019; Wang et al. 2021).

Basándonos en el hecho de que fenofibrato podría tener distintos roles, que podrían depender o no de la expresión de IL-10, evaluamos el efecto del fenofibrato en ratones WT y ratones deficientes en IL-10. En éstos últimos el tratamiento con fenofibrato mejora la función cardíaca. Esto sugiere que los efectos de la droga son en parte independientes de IL-10 y no están relacionados con la carga parasitaria. En este sentido, previamente reportamos que el tratamiento con fenofibrato no altera la parasitemia ni el parasitismo tisular en un modelo murino de enfermedad de Chagas crónica (Cevey et al. 2017).

Notablemente, la ausencia de IL-10 en ratones IL-10 KO se correlaciona con el incremento de la extensión de los infiltrados inflamatorios en el tejido cardíaco. En otros modelos experimentales murinos de infarto de miocardio (Krishnamurthy et al. 2011) y diabetes (Wang et al. 2016) se describe que IL-10 es necesaria para el reclutamiento de células progenitoras endoteliales al foco inflamatorio. En el caso de infección con tripanosomas africanos IL-10 es un potente inhibidor de la respuesta inflamatoria, sin embargo no es capaz de modular la carga parasitaria, por lo cual la respuesta inmune se desregula y se vuelve exacerbada (Stijlemans et al. 2022). Se ha reportado en un modelo experimental de obesidad en ratones KO para IL-10, que la deficiencia de esta citoquina correlaciona con un mayor grado de inflamación, fibrosis e infiltrado celular en riñones (Kim et al. 2021). Nuestros hallazgos apoyan el hecho de que la IL-10 es requerida para modular el infiltrado celular en el corazón y, contrariamente a lo que ocurre en el modelo de infección mixta, fenofibrato es incapaz de ejercer este rol en ratones IL-10 KO. Sin embargo, este efecto no es observado en ratones WT del modelo de infección con cepa única, probablemente porque la infiltración en el tejido cardíaco es escasa por la baja virulencia del clon K98 de *T. cruzi*.

La respuesta inmune frente a la infección por *T. cruzi* es compleja y depende de diversos factores como la cepa del parásito, la respuesta del hospedador y la etapa de la enfermedad (Cerbán et al. 2020). La intensa y continua respuesta inflamatoria, en conjunto con la expresión local de mediadores pro-inflamatorios como IL-6, IL-17, TNF α y NOS2, contribuyen al daño tisular (Alba-Alvarado et al. 2020; Magalhães et al. 2022). Asociado a esto se observa que la ausencia de IL-10 provoca una severa disfunción cardíaca que tiene correlación con el incremento de la producción de IL-6, IL-17, TNF α y TGF β . Pudimos observar que fenofibrato fue capaz de reducir la expresión de mediadores pro-inflamatorios tanto en el modelo de infección mixta en ratones WT como en el modelo de infección con el clon K98. Este fenómeno está asociado a la capacidad de fenofibrato de reducir la expresión de TGF β , que es el principal regulador de la fibrosis (Meng et al. 2016). Además, se ha reportado que esta citoquina está involucrada en la remodelación del tejido cardíaco dado que altera el patrón de secreción de metaloproteasas, colágeno, fibronectina y otros mediadores fibrogénicos (Frangogiannis 2019). En el corazón el proceso de fibrosis se encuentra vinculado a la alta expresión de TNF α y TGF β (Sivasubramanian et al. 2001). Entonces, el fenofibrato puede actuar simultáneamente reduciendo la expresión de ambos mediadores, lo que es un efecto independiente de IL-10.

A pesar de que en ratones WT, del modelo de infección con una sola cepa de *T. cruzi*, la IL-10 permanece inalterada, podría tener un rol que favorezca la remodelación cardíaca. En este sentido, se ha demostrado que promueve la polarización de macrófagos M1 a M2 y la degradación de ácido hialurónico, en un modelo murino de infarto de miocardio (Jung et al. 2017). En nuestro modelo de ratones KO para IL-10, observamos que, mientras los ratones WT infectados muestran un claro cambio de perfil de M1 a M2 y que éste es potenciado en aquellos ratones WT que recibieron el tratamiento con fenofibrato, en los ratones IL-10 KO no hubo tal polarización. La diferenciación hacia el perfil M2 está asociada a un aumento de la expresión del Receptor de Manosa y de Ym1, en tanto que la expresión de Fizz no se ve modificada. En este sentido, Atochina et al. (Atochina et al. 2008) reportaron que el glicano LNFPIII regula positivamente a Arg-1 e Ym1 en macrófagos. Sin embargo, los macrófagos activados por LNFPIII no muestran regulación positiva de otros marcadores de perfil reparador como Fizz, MGL-1 y MMR *in vivo*. Resultados similares fueron mostrados por Osada et al. (Yoshio Osada et al. 2017) en un modelo murino de diabetes inducida por estreptozotocina, infectados con *Schistosoma mansoni*. Dado que en los ratones WT, de los dos modelos utilizados en esta tesis, observamos aumento de la expresión de Fizz podemos plantear la hipótesis que IL-10 es requerida para la regulación de Fizz.

En nuestro modelo de cardiomiopatía chagásica, los ratones KO para IL-10 tratados con fenofibrato no muestran un cambio de perfil de M1 a M2, que es un proceso crucial para la

remodelación cardíaca. Sin embargo, aún en ausencia de IL-10, el fenofibrato es capaz de reducir la transcripción de TGF β , limitando la acumulación de colágeno en el tejido cardíaco, como se observó en los cortes histológicos de secciones del corazón. Más aún, encontramos que la disminución de la expresión de citoquinas pro-inflamatorias y de TGF β está asociada a una mejora en la funcionalidad cardíaca. De forma similar, se ha reportado una mejora en la función cardíaca asociada a la disminución de la concentración sérica de TGF β a través de un tratamiento farmacológico (Ferreira et al. 2019).

Ha sido sugerido que la peor progresión clínica de la Cardiomiopatía Chagásica Crónica (CCC) se asocia con el aumento de la concentración de IL-17 en suero y de la frecuencia de células Th 17 alternativas (Almeida et al. 2018). No obstante, otros autores han observado correlación positiva entre los niveles de IL-17A y la fracción de eyección ventricular, proponiendo que el aumento de IL-17A es un marcador de buena prognosis para CCC (Sousa et al. 2017). A pesar de esto, en ratones C57Bl/6 el tratamiento con un anticuerpo monoclonal anti-TNF α (Infliximab TM) reduce la frecuencia de células T CD4 IL-17A⁺ y aumenta la frecuencia de células T CD4 IL-10⁺, también incrementa la frecuencia de células IL-10⁺ Ly6c⁺ y de células F4/80⁺. Este tratamiento mejora la función cardíaca sugiriendo un rol deletéreo de IL-17 en un modelo murino (Pereira et al. 2014).

Dado que encontramos que la mejora en la disfunción cardíaca y de la respuesta inflamatoria está asociada a la inhibición de la expresión de IL-17 y de ROR γ t, podría considerarse que el tratamiento con fenofibrato resulta en un mejor resultado mediante la inhibición de células Th17. Además de IL-17, la expresión de otras citoquinas pro-inflamatorias disminuye con el tratamiento con fenofibrato. En este sentido, se ha reportado que fenofibrato reduce la sintomatología en ratones C3H/HeJB IL-10 KO con colitis inducida por dextrano y que el efecto es debido a la inhibición de la expresión de IL-17 (Lee et al. 2007). Ya que IL-6 y TGF β son necesaria para la diferenciación a Th17, sería posible que, en nuestro modelo, el fenofibrato limite la concentración de ambas citoquinas, lo cual disminuiría o inhibiría la diferenciación de linfocitos T CD4 a Th17. De hecho, la disminución de la concentración sérica de IL-17, observada luego del tratamiento, se asocia a una reducción significativa en la transcripción de ROR γ t, el regulador maestro para el perfil Th17. En relación con esto, se ha reportado la inhibición *in vitro* de la diferenciación a Th17 mediante un tratamiento con fenofibrato (Zhou et al. 2012). Además, esta inhibición juega un rol beneficioso en un modelo experimental de miocarditis autoinmune en ratones (Chang et al. 2019). Es interesante destacar que la expresión de FOXP3 permanece inalterada luego del tratamiento con fenofibrato, sugiriendo que la droga ejercería su efecto anti-inflamatorio principalmente mediante la modulación del perfil pro-inflamatorio de la respuesta inmune. Este resultado difiere del observado por Zhou

et al. (Zhou et al. 2012), quienes muestran la capacidad de fenofibrato para promover la diferenciación *in vitro* de células Treg, y de aquellos de Chang 2019 (Chang et al. 2019) que muestran un aumento de la expresión de FOXP3 en corazones de ratas con miocarditis autoinmune experimental, después del tratamiento con fenofibrato. Dicha discordancia se puede atribuir a múltiples factores, incluyendo el *background* genético de la cepa de ratón y de la cepa de *T. cruzi* utilizadas, y la etología de las condiciones patológicas (autoinmune vs infecciosa) analizadas.

Nuestros resultados muestran que, en ausencia de IL-10, fenofibrato es capaz de mejorar la función cardíaca de ratones infectados con *T. cruzi* modulando a IL-17, entre otras citoquinas, y previniendo el desarrollo de fibrosis patológica. Más aún, los resultados hacen hincapié en que IL-10 es necesaria para promover un perfil reparador en el tejido cardíaco caracterizado por la expresión de marcadores M2 en macrófagos. Estos hallazgos pueden resultar útiles para diseñar terapias combinadas, que no solo reduzcan la carga parasitaria, sino que al mismo tiempo disminuyan los efectos nocivos de la respuesta inflamatoria exacerbada y persistente.

BIBLIOGRAFÍA

- Abulaban, Ahmad A., Hayder M. Al-kuraishy, Ali I. Al-Gareeb, Engy Elekhrawy, Asma Alanazi, Athanasios Alexiou, Marios Papadakis, and Gaber El Saber Batiha. 2024. "Role of Fenofibrate in Multiple Sclerosis." *European Journal of Medical Research* 29 (1): 1–13. <https://doi.org/10.1186/s40001-024-01700-2>.
- Acevedo, Gonzalo R., Magalí C. Girard, and Karina A. Gómez. 2018. "The Unsolved Jigsaw Puzzle of the Immune Response in Chagas Disease." *Frontiers in Immunology*. Frontiers Media S.A. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2018.01929>.
- Alba-Alvarado, Mariana De, Martha Irene Bucio-Torres, Edgar Zenteno, Enrique Sampedro-Carrillo, Mariana Hernández-Lopez, Olivia Reynoso-Ducoing, Elia Torres-Gutiérrez, et al. 2020. "Response to Infection by Trypanosoma Cruzi in a Murine Model." *Frontiers in Veterinary Science* 7 (October): 1–11. <https://doi.org/10.3389/fvets.2020.568745>.
- Alba Soto, Catalina D., Maria Elisa Solana, Carolina V. Poncini, Agustina M. Pino-Martinez, Valeria Tekiel, and Stella Maris González-Cappa. 2010. "Dendritic Cells Devoid of IL-10 Induce Protective Immunity against the Protozoan Parasite Trypanosoma Cruzi." *Vaccine* 28 (46): 7407–13. <https://doi.org/10.1016/j.vaccine.2010.08.105>.
- Albareda, María Cecilia, and Susana Adriana Laucella. 2015. "Modulation of Trypanosoma Cruzi-Specific T-Cell Responses after Chemotherapy for Chronic Chagas Disease." *Memorias Do Instituto Oswaldo Cruz* 110 (3): 414–21. <https://doi.org/10.1590/0074-02760140386>.
- Almeida, M. S., V. M.B. Lorena, C. de A. Medeiros, W. O. Junior, M. da G.A.M. Cavalcanti, S. M. Martins, and C. N.L. de Moraes. 2018. "Alternative Th17 and CD4+CD25+FoxP3+ Cell Frequencies Increase and Correlate with Worse Cardiac Function in Chagas Cardiomyopathy." *Scandinavian Journal of Immunology* 87 (4): 1–11. <https://doi.org/10.1111/sji.12650>.
- Andrade DV, Gollob KJ, Dutra WO. 2014. "Acute Chagas Disease: New Global Challenges for an Old Neglected Disease." *PLoS Neglected Tropical Diseases* 8 (7): doi.org/10.1371/journal.pntd.0003010.
- Andrade, Z A, S G Andrade, and M Sadigursky. 1987. "Enhancement of Chronic Trypanosoma Cruzi Myocarditis in Dogs Treated with Low Doses of Cyclophosphamide." *The American Journal of Pathology*. 127 (3): 467–73.

- <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/3296771>.
- Angheben, Andrea, Lucia Boix, Dora Buonfrate, Federico Gobbi, Zeno Bisoffi, Simonetta Pupella, Giorgio Gandini, and Giuseppe Aprili. 2015. "Chagas Disease and Transfusion Medicine: A Perspective from Non-Endemic Countries." *Blood Transfusion* 13: 540–50. <https://doi.org/10.2450/2015.0040-15>.
- Antinori, Spinello, Laura Galimberti, Roberto Bianco, Romualdo Grande, Massimo Galli, and Mario Corbellino. 2017. "Chagas Disease in Europe: A Review for the Internist in the Globalized World." *European Journal of Internal Medicine* 43: 6–15. <https://doi.org/10.1016/j.ejim.2017.05.001>.
- Araújo-Jorge, T. C., M. C. Waghbi, S. Bailly, and J. J. Feige. 2012. "The TGF- β Pathway as an Emerging Target for Chagas Disease Therapy." *Clinical Pharmacology and Therapeutics*. <https://doi.org/10.1038/clpt.2012.102>.
- Araújo, F.F. de, R. Corrêa-Oliveira, M.O.C. Rocha, A.T. Chaves, J.A. Fiuza, R.C.G. Fares, K.S. Ferreira, et al. 2012. "Foxp3+CD25high 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 (8): 768–77. <https://doi.org/10.1016/J.IMBIO.2012.04.008>.
- Araújo, Fernanda Fortes de, Danielle Marquete Vitelli-Avelar, Andréa Teixeira-Carvalho, Paulo Renato Zuquim Antas, Juliana Assis Silva Gomes, Renato Sathler-Avelar, Manoel Otávio Costa Rocha, et al. 2011. "Regulatory T Cells Phenotype in Different Clinical Forms of Chagas' Disease." Edited by Helton da Costa Santiago. *PLoS Neglected Tropical Diseases* 5 (5): e992. <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0000992>.
- Atochina, Olga, Akram A. Da'dara, Mirjam Walker, and Donald A. Harn. 2008. "The Immunomodulatory Glycan LNFPIII Initiates Alternative Activation of Murine Macrophages in Vivo." *Immunology* 125 (1): 111–21. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2567.2008.02826.x>.
- Balakumar, Pitchai, Ankur Rohilla, and Nanjaian Mahadevan. 2011. "Pleiotropic Actions of Fenofibrate on the Heart." *Pharmacological Research* 63 (1): 8–12. <https://doi.org/10.1016/j.phrs.2010.11.002>.
- Balakumar, Pitchai, Ramanathan Sambathkumar, Nanjaian Mahadevan, Abdullatif Bin Muhsinah, Abdulrhman Alsayari, Nallasamy Venkateswaramurthy, and

- Sokkalingam A. Dhanaraj. 2019. "Molecular Targets of Fenofibrate in the Cardiovascular-Renal Axis: A Unifying Perspective of Its Pleiotropic Benefits." *Pharmacological Research* 144 (2): 132–41. <https://doi.org/10.1016/j.phrs.2019.03.025>.
- Baron, Monique Andrade, Ludmila Rodrigues Pinto Ferreira, Priscila Camillo Teixeira, Ana Iochabel Soares Moretti, Ronaldo Honorato Barros Santos, Amanda Farage Frade, Andréia Kuramoto, et al. 2022. "Matrix Metalloproteinase 2 and 9 Enzymatic Activities Are Selectively Increased in the Myocardium of Chronic Chagas Disease Cardiomyopathy Patients: Role of TIMPs." *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology* 12 (March): 1–12. <https://doi.org/10.3389/fcimb.2022.836242>.
- Bern, Caryn, Diana L Martin, and Robert H Gilman. 2011. "Acute and Congenital Chagas Disease." *Advances in Parasitology* 75: 19–47. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-385863-4.00002-2>.
- Bestetti, Reinaldo B., Renata Dellalibera-Joviliano, Gabriel S. Lopes, Milton Faria-Jr, Rosemary Furlan-Daniel, Kenio C. Lopes, and Divino R. Batista. 2018. "Determination of the Th1, Th2, Th17, and Treg Cytokine Profile in Patients with Chronic Chagas Heart Disease and Systemic Arterial Hypertension." *Heart and Vessels*, no. 0123456789. <https://doi.org/10.1007/s00380-018-1228-z>.
- Bocchi, Edimar Alcides, Reinaldo Bulgarelli Bestetti, Mauricio Ibrahim Scanavacca, Edecio Cunha Neto, and Victor Sarli Issa. 2017. "Chronic Chagas Heart Disease Management." *Journal of the American College of Cardiology* 70 (12): 1510–24. <https://doi.org/10.1016/j.jacc.2017.08.004>.
- Bona, Elidiana De, Kárita Cláudia Freitas Lidani, Lorena Bavia, Zahra Omidian, Luiza Helena Gremski, Thaisa Lucas Sandri, and Iara J. de Messias Reason. 2018. "Autoimmunity in Chronic Chagas Disease: A Road of Multiple Pathways to Cardiomyopathy?" *Frontiers in Immunology*. Frontiers Media S.A. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2018.01842>.
- Bonney, Kevin M., Daniel J. Luthringer, Stacey A. Kim, Nisha J. Garg, and David M. Engman. 2019. "Pathology and Pathogenesis of Chagas Heart Disease." *Annual Review of Pathology: Mechanisms of Disease*. Annual Reviews Inc. <https://doi.org/10.1146/annurev-pathol-020117-043711>.

- Brener, Z. 1962. "Observations on Immunity to Superinfections in Mice Experimentally Inoculated with *Trypanosoma Cruzi* and Subjected to Treatment." *Revista Do Instituto de Medicina Tropical de Sao Paulo* 4 (January): 119–23. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/13872811>.
- Brisse, Sylvain, Christian Barnabe, and Michel Tibayrenc. 2000. "Identification of Six *Trypanosoma Cruzi* Phylogenetic Lineages by Random Amplified Polymorphic DNA and Multilocus Enzyme Electrophoresis." *International Journal for Parasitology* 30 (1): 35–44.
- Bukari. 2018. "Protective Effect of Fenofibrate against Ischemia-Reperfusion Induced Cardiac Arrhythmias in Isolated Rat Hearts." *Fundamental Clinical Pharmacology* 32: 141–46. <https://doi.org/10.1111/fcp.12342>.
- Buscaglia, Carlos A, and Javier M. Di Noia. 2003. "Trypanosoma Cruzi Clonal Diversity and the Epidemiology of Chagas' Disease." *Microbes and Infection* 5 (5): 419–27. [https://doi.org/10.1016/S1286-4579\(03\)00050-9](https://doi.org/10.1016/S1286-4579(03)00050-9).
- Cardillo, Fabíola, Rosa Teixeira de Pinho, Paulo Renato Zuquim Antas, and José Mengel. 2015. "Immunity and Immune Modulation in *Trypanosoma Cruzi* Infection." *Pathogens and Disease* 73 (9): ftv082. <https://doi.org/10.1093/femspd/ftv082>.
- Cardinal, Marta V., Marta A. Lauricella, Leonardo A. Ceballos, Leonardo Lanati, Paula L. Marcet, Mariano J. Levin, Uriel Kitron, Ricardo E. Gürtler, and Alejandro G. Schijman. 2008. "Molecular Epidemiology of Domestic and Sylvatic *Trypanosoma Cruzi* Infection in Rural Northwestern Argentina." *International Journal for Parasitology* 38 (13): 1533–43. <https://doi.org/10.1016/j.ijpara.2008.04.010>.
- Cardoso, Mariana S., João Luís Reis-Cunha, and Daniella C. Bartholomeu. 2016. "Evasion of the Immune Response by *Trypanosoma Cruzi* during Acute Infection." *Frontiers in Immunology*. Frontiers Media S.A. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2015.00659>.
- Carlier, Yves, Sergio Sosa-Estani, Alejandro O Luquetti, and Pierre Buekens. 2015. "Congenital Chagas Disease: An Update." *Mem Inst Oswaldo Cruz Rio de Janeiro* 110 (3): 363–68. <https://doi.org/10.1590/0074-02760140405>.
- Carlier, Yves, Carine Truysens, Philippe Deloron, and François Peyron. 2012. "Congenital Parasitic Infections: A Review." *Acta Tropica* 121 (2): 55–70. <https://doi.org/10.1016/j.actatropica.2011.10.018>.

- Castillero, Estíbaliz, María Paz Nieto-Bona, Carmen Fernández-Galaz, Ana Isabel Martín, María López-Menduiña, Miriam Granado, María Angeles Villanúa, and Asunción López-Calderón. 2011. "Fenofibrate, a PPAR α Agonist, Decreases Atrogenes and Myostatin Expression and Improves Arthritis-Induced Skeletal Muscle Atrophy." *American Journal of Physiology - Endocrinology and Metabolism* 300 (5): 790–99. <https://doi.org/10.1152/ajpendo.00590.2010>.
- Celentano, A M, and S M González Cappa. 1993. "In Vivo Macrophage Function in Experimental Infection with Trypanosoma Cruzi Subpopulations." *Acta Tropica* 55 (3): 171–80. [https://doi.org/10.1016/0001-706x\(93\)90075-m](https://doi.org/10.1016/0001-706x(93)90075-m).
- Cerbán, Fabio Marcelo, Cinthia Carolina Stempin, Ximena Volpini, Eugenio Antonio Carrera Silva, Susana Gea, and Claudia Cristina Motran. 2020. "Signaling Pathways That Regulate Trypanosoma Cruzi Infection and Immune Response." *Biochimica et Biophysica Acta - Molecular Basis of Disease*. <https://doi.org/10.1016/j.bbadis.2020.165707>.
- Cevey, Ágata C., Gerardo A. Mirkin, Martín Donato, María J. Rada, Federico N. Penas, Ricardo J. Gelpi, and Nora B. Goren. 2017. "Treatment with Fenofibrate plus a Low Dose of Benznidazole Attenuates Cardiac Dysfunction in Experimental Chagas Disease." *International Journal for Parasitology: Drugs and Drug Resistance* 7 (3): 378–87. <https://doi.org/10.1016/j.ijpddr.2017.10.003>.
- Chagas, Carlos. 1909. "Nova Tripanozomíaze Humana: Estudos Sobre a Morfologia e o Ciclo Evolutivo Do Schizotrypanum Cruzi n. Gen., n. Sp., Agente Etiológico de Nova Entidade Morbida Do Homem." *Memórias Do Instituto Oswaldo Cruz*. <https://doi.org/10.1590/S0074-02761909000200008>.
- Chang, He, Fayun Zhao, Xinwen Xie, Yanchun Liao, Ying Song, Chunxiao Liu, Yang Wu, et al. 2019. "PPAR α Suppresses Th17 Cell Differentiation through IL-6/STAT3/ROR γ t Pathway in Experimental Autoimmune Myocarditis." *Experimental Cell Research* 375 (1): 22–30. <https://doi.org/10.1016/J.YEXCR.2018.12.005>.
- Chaplin, David D. 2010. "Overview of the Immune Response." *Journal of Allergy and Clinical Immunology* 125 (2): S345. <https://doi.org/10.1016/j.jaci.2010.01.002>.
- Cheng, Huilei, Yanqin Xi, Xianna Chi, Yanxia Wu, and Guizhi Liu. 2016. "Fenofibrate Treatment of Rats with Experimental Autoimmune Myocarditis by Alleviating

- Treg/Th17 Disorder.” *Central-European Journal of Immunology* 41 (1): 64–70.
<https://doi.org/10.5114/ceji.2016.58817>.
- Chevillard, Christophe, João Paulo Silva Nunes, Amanda Farage Frade, Rafael Ribeiro Almeida, Ramendra Pati Pandey, Marilda Savóia Nascimento, Jorge Kalil, and Edecio Cunha-Neto. 2018. “Disease Tolerance and Pathogen Resistance Genes May Underlie Trypanosoma Cruzi Persistence and Differential Progression to Chagas Disease Cardiomyopathy.” *Frontiers in Immunology* 9: 2791.
<https://doi.org/10.3389/fimmu.2018.02791>.
- Chowdhury, Imran H., Sue Jie Koo, Shivali Gupta, Lisa Yi Liang, Bojlul Bahar, Laura Silla, Julio Nuñez-Burgos, Natalia Barrientos, Maria Paola Zago, and Nisha Jain Garg. 2017. “Gene Expression Profiling and Functional Characterization of Macrophages in Response to Circulatory Microparticles Produced during Trypanosoma Cruzi Infection and Chagas Disease.” *Journal of Innate Immunity* 9 (2): 203–16.
<https://doi.org/10.1159/000451055>.
- Christofides, Anthos, Eirini Konstantinidou, Chinmay Jani, and Vassiliki A. Boussiotis. 2021. “The Role of Peroxisome Proliferator-Activated Receptors (PPAR) in Immune Responses.” *Metabolism: Clinical and Experimental* 114: 1–13.
<https://doi.org/10.1016/j.metabol.2020.154338>.
- Clockaerts, S., Y. M. Bastiaansen-Jenniskens, C. Feijt, J. A.N. Verhaar, J. Somville, L. S. De Clerck, and G. J.V.M. Van Osch. 2011. “Peroxisome Proliferator Activated Receptor Alpha Activation Decreases Inflammatory and Destructive Responses in Osteoarthritic Cartilage.” *Osteoarthritis and Cartilage* 19 (7): 895–902.
<https://doi.org/10.1016/j.joca.2011.03.010>.
- Crisafulli, Concetta, and Salvatore Cuzzocrea. 2009. “The Role of Endogenous and Exogenous Ligands for the Peroxisome Proliferator-Activated Receptor Alpha (PPAR- α) in the Regulation of Inflammation in Macrophages.” *Shock* 32 (1): 62–73.
<https://doi.org/10.1097/SHK.0b013e31818bbad6>.
- Cruz, Jader Santos, Fabiana Simão Machado, Catherine Ropert, and Danilo Roman-Campos. 2016. “Molecular Mechanisms of Cardiac Electromechanical Remodeling during Chagas Disease: Role of TNF and TGF- β ” *Trends in Cardiovascular Medicine* 27 (2): 81–91. <https://doi.org/10.1016/j.tcm.2016.08.003>.
- Cunha-neto, Edecio, and Christophe Chevillard. 2014. “Chagas Disease

- Cardiomyopathy: Immunopathology and Genetics.” *Mediators of Inflammation* 14: 1–11. <https://doi.org/10.1155/2014/683230>.
- Dai, Fang, Tian Jiang, Ying-ying Bao, Guan-jun Chen, Li Chen, Qiu Zhang, and Yun-xia Lu. 2016. “Fenofibrate Improves High-Fat Diet-Induced and Palmitate-Induced Endoplasmic Reticulum Stress and Inflammation in Skeletal Muscle.” *Life Sciences* 157 (July): 158–67. <https://doi.org/10.1016/j.lfs.2016.06.008>.
- Deb, Arjun, and Eric Ubil. 2014. “Cardiac Fibroblast in Development and Wound Healing.” *Journal of Molecular and Cellular Cardiology*. <https://doi.org/10.1016/j.yjmcc.2014.02.017>.
- Devchand, Pallavi R., Hansjörg Keller, Jeffrey M. Peters, Manuel Vazquez, Frank J. Gonzalez, and Walter Wahli. 1996. “The PPAR α -Leukotriene B₄ Pathway to Inflammation Control.” *Nature* 384 (6604): 39–43. <https://doi.org/10.1038/384039a0>.
- Dinarello, Charles a. 2007. “Historical Review of Cytokines.” *European Journal of Immunology* 37 (Suppl 1): S34–45. <https://doi.org/10.1002/eji.200737772.Historical>.
- Dutra, W. O., C. A S Menezes, L. M D Magalhães, and K. J. Gollob. 2014. “Immunoregulatory Networks in Human Chagas Disease.” *Parasite Immunology*. <https://doi.org/10.1111/pim.12107>.
- Echeverria, Luis E, and Carlos A Morillo. 2019. “American Trypanosomiasis (Chagas Disease).” *Infectious Disease Clinics of North America* 33 (1): 119–34. <https://doi.org/10.1016/j.idc.2018.10.015>.
- Eickhoff, C S, C T Lawrence, J E Sagartz, L A Bryant, A J Labovitz, S S Gala, and D F Hoft. 2010. “ECG Detection of Murine Chagasic Cardiomyopathy.” *Journal of Parasitology* 96 (4): 758–64. <https://doi.org/10.1645/GE-2396.1>.
- Fares, Rafaelle Christine Gomes, Juliana de Assis Silva Gomes, Luciana Ribeiro Garzoni, Mariana Caldas Waghbi, Roberto Magalhães Saraiva, Nayara Ingrid Medeiros, Roberta Oliveira-Prado, et al. 2013. “Matrix Metalloproteinases 2 and 9 Are Differentially Expressed in Patients with Indeterminate and Cardiac Clinical Forms of Chagas Disease.” *Infection and Immunity* 81 (10): 3600. <https://doi.org/10.1128/IAI.00153-13>.
- Ferragut, Fátima Acevedo GR and Gomez KA. 2021. “T Cell Specifi City : A Great

- Challenge in Chagas Disease.” *Frontiers in Immunology* 12 (June).
<https://doi.org/10.3389/fimmu.2021.674078>.
- Ferreira, Roberto Rodrigues, Rayane da Silva Abreu, Glaucia Vilar-Pereira, Wim Degraeve, Marcelo Meuser-Batista, Nilma Valéria Caldeira Ferreira, Otacílio da Cruz Moreira, et al. 2019. “TGF- β Inhibitor Therapy Decreases Fibrosis and Stimulates Cardiac Improvement in a Pre-Clinical Study of Chronic Chagas’ Heart Disease.” *PLOS Neglected Tropical Diseases* 13 (7): e0007602.
<https://doi.org/10.1371/JOURNAL.PNTD.0007602>.
- Ferreira, Roberto Rodrigues, Mariana Caldas Waghbi, Sabine Bailly, Jean Jacques Feige, Alejandro M. Hasslocher-Moreno, Roberto M. Saraiva, and Tania C. Araujo-Jorge. 2022. “The Search for Biomarkers and Treatments in Chagas Disease: Insights From TGF-Beta Studies and Immunogenetics.” *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology* 11 (February): 1–9.
<https://doi.org/10.3389/fcimb.2021.767576>.
- Foligheddu, MT, M Górgolas, and JM Ramos. 2017. “Orally-Transmitted Chagas Disease.” *Medicina Clínica* 148 (3): 125–31.
<https://doi.org/10.1016/j.medcle.2017.02.007>.
- Frangogiannis, Nikolaos G. 2019. “Cardiac Fibrosis: Cell Biological Mechanisms, Molecular Pathways and Therapeutic Opportunities.” *Molecular Aspects of Medicine* 65 (February): 70–99. <https://doi.org/10.1016/J.MAM.2018.07.001>.
- Freilij, H., L. Muller, and S. M. Gonzalez Cappa. 1983. “Direct Micromethod for Diagnosis of Acute and Congenital Chagas’ Disease.” *Journal of Clinical Microbiology* 18 (2): 327–30. <https://doi.org/10.1128/jcm.18.2.327-330.1983>.
- Fresno, Manuel, and Núria Gironès. 2018. “Regulatory Lymphoid and Myeloid Cells Determine the Cardiac Immunopathogenesis of Trypanosoma Cruzi Infection.” *Frontiers in Microbiology* 9 (MAR): 351.
<https://doi.org/10.3389/fmicb.2018.00351>.
- Galdiero, M. 2018. “Cancer Inflammation and Cytokines.” *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology* 10 (8): 1–17.
<https://doi.org/10.1101/cshperspect.a028662>.
- Gobin, Emily, Kayla Bagwell, John Wagner, David Mysona, Sharmila Sandirasegarane, Nathan Smith, Shan Bai, Ashok Sharma, Robert Schleifer, and Jin Xiong She. 2019.

- “A Pan-Cancer Perspective of Matrix Metalloproteases (MMP) Gene Expression Profile and Their Diagnostic/Prognostic Potential.” *BMC Cancer* 19 (1): 1–10. <https://doi.org/10.1186/s12885-019-5768-0>.
- González Cappa, S M, P Chiale, G E del Prado, A M Katzin, G W de Martini, E D de Isola, L Abramo Orrego, and E L Segura. 1980. “Isolation of a Strain of Trypanosoma Cruzi from a Patient with Chronic Chagas Cardiomyopathy and Its Biological Characterization.” *Medicina* 40 Suppl 1: 63–68. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/6779089>.
- González Cappa, S M, A M Katzin, N Añasco, and S Lajmanovich. 1981. “Comparative Studies on Infectivity and Surface Carbohydrates of Several Strains of Trypanosoma Cruzi.” *Medicina* 41 (5): 549–55. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/6808285>.
- González, Florencia, Silvina Villar, Luciano D’Attilio, Rodolfo Leiva, Julia Marquez, Susana Lioi, Juan Beloscar, Oscar Bottasso, and Ana Rosa Perez. 2018. “Dysregulated Network of Immune, Endocrine and Metabolic Markers Is Associated to More Severe Human Chronic Chagas Cardiomyopathy.” *NeuroImmunoModulation* 25 (3): 119–28. <https://doi.org/10.1159/000491699>.
- Gourbiere, S, P Dorn, F Tripet, and E Dumonteil. 2012. “Genetics and Evolution of Triatomines : From Phylogeny to Vector Control.” *Heredity* 108 (February 2011): 190–202. <https://doi.org/10.1038/hdy.2011.71>.
- Grygiel-Górniak, Bogna. 2014. “Peroxisome Proliferator-Activated Receptors and Their Ligands: Nutritional and Clinical Implications - A Review.” *Nutrition Journal* 13 (1): 1–10. <https://doi.org/10.1186/1475-2891-13-17>.
- Guedes, Paulo Marcos Matta, Fredy Roberto Salazar Gutierrez, Grace Kelly Silva, Renata Dellalibera-Joviliano, Gerson Jhonatan Rodrigues, Lusiane Maria Bendhack, Anis Rassi, et al. 2012. “Deficient Regulatory T Cell Activity and Low Frequency of IL-17-Producing T Cells Correlate with the Extent of Cardiomyopathy in Human Chagas’ Disease.” Edited by Ricardo T. Gazzinelli. *PLoS Neglected Tropical Diseases* 6 (4): e1630. <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0001630>.
- Gürtler, Ricardo E., and M. V. Cardinal. 2015. “Reservoir Host Competence and the Role of Domestic and Commensal Hosts in the Transmission of Trypanosoma Cruzi.” *Acta Tropica* 151 (1): 32–50.

- <https://doi.org/10.1016/j.actatropica.2015.05.029>.
- Gutierrez, F. R.S., P. M.M. Guedes, R. T. Gazzinelli, and J. S. Silva. 2009. "The Role of Parasite Persistence in Pathogenesis of Chagas Heart Disease." *Parasite Immunology*. <https://doi.org/10.1111/j.1365-3024.2009.01108.x>.
- Gutierrez, Fredy R.S., Tiago W.P. Mineo, Wander R. Pavanelli, Paulo M.M. Guedes, and João S. Silva. 2009. "The Effects of Nitric Oxide on the Immune System during Trypanosoma Cruzi Infection." *Memorias Do Instituto Oswaldo Cruz* 104 (SUPPL. 1): 236–45. <https://doi.org/10.1590/S0074-02762009000900030>.
- Harmon, Gregory S., Michael T. Lam, and Christopher K. Glass. 2011. "PPARs and Lipid Ligands in Inflammation and Metabolism." *Chemical Reviews* 111 (10): 6321–40. <https://doi.org/10.1021/cr2001355>.
- Hillion, Sophie, Marina I. Arleevskaya, Patrick Blanco, Anne Bordron, Wesley H. Brooks, Jean Yves Cesbron, Srini Kaveri, Eric Vivier, and Yves Renaudineau. 2020. "The Innate Part of the Adaptive Immune System." *Clinical Reviews in Allergy and Immunology* 58 (2): 151–54. <https://doi.org/10.1007/s12016-019-08740-1>.
- Hovsepian, Eugenia, Gerardo A Mirkin, Federico Penas, Anna Manzano, Ramon Bartrons, and Nora B Goren. 2011. "Modulation of Inflammatory Response and Parasitism by 15-Deoxy- $\Delta(12,14)$ Prostaglandin J(2) in Trypanosoma Cruzi-Infected Cardiomyocytes." *International Journal for Parasitology* 41 (5): 553–62. <https://doi.org/10.1016/j.ijpara.2010.12.002>.
- Hovsepian, Eugenia, Federico Penas, and Nora B. Goren. 2010. "15-Deoxy-Delta12,14 Prostaglandin GJ2 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 (Augusta, Ga.)* 34 (1): 60–67. <https://doi.org/10.1097/SHK.0b013e3181cdc398>.
- Hovsepian, Eugenia, Federico Penas, Gerardo A. Mirkin, and Nora B. Goren. 2012. "Role of PPARs in Trypanosoma Cruzi Infection: Implications for Chagas Disease Therapy." *PPAR Research* 2012 (January): 528435. <https://doi.org/10.1155/2012/528435>.
- Issemann, Isabelle, and Stephen Green. 1990. "Activation of a Member of the Steroid Hormone Receptor Superfamily by Peroxisome Proliferators." *Nature* 347 (6294):

- 645–50. <https://doi.org/10.1038/347645a0>.
- Ivanov, Ivaylo I, Brent S Mckenzie, Liang Zhou, Carlos E Tadokoro, Alice Lepelley, Juan J Lafaille, Daniel J Cua, and Dan R Littman. 2006. “The Orphan Nuclear Receptor ROR γ t Directs the Differentiation Program of Proinflammatory IL-17 + T Helper Cells,” 1121–33. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2006.07.035>.
- Iwasaki, Akiko, and Ruslan Medzhitov. 2015. “Control of Adaptive Immunity by the Innate Immune System.” *Nature Immunology* 16 (4): 343–53. <https://doi.org/10.1038/ni.3123>.
- Janczewski. 2010. “NIH Public Access.” *Heart Failure Reviews* 15 (5): 431–45. <https://doi.org/10.1007/s10741-010-9167-5>.Modulation.
- Jen, Hsu-Lung, Wei-Hsian Yin, Jaw-Wen Chen, and Shing-Jong Lin. 2016. “Endothelin-1-Induced Cell Hypertrophy in Cardiomyocytes Is Improved by Fenofibrate: Possible Roles of Adiponectin.” *Journal of Atherosclerosis and Thrombosis*, September. <https://doi.org/10.5551/jat.36368>.
- Jung, Mira, Yonggang Ma, Rugmani Padmanabhan Iyer, Kristine Y DeLeon-Pennell, Andriy Yabluchanskiy, Michael R Garrett, and Merry L Lindsey. 2017. “IL-10 Improves Cardiac Remodeling after Myocardial Infarction by Stimulating M2 Macrophage Polarization and Fibroblast Activation.” *Basic Research in Cardiology* 112 (3): 33. <https://doi.org/10.1007/s00395-017-0622-5>.
- Kadomoto, Suguru, Kouji Izumi, and Atsushi Mizokami. 2022. “Macrophage Polarity and Disease Control.” *International Journal of Molecular Sciences* 23 (1). <https://doi.org/10.3390/ijms23010144>.
- Keating, S. M., X. Deng, F. Fernandes, E. Cunha-Neto, A. L. Ribeiro, B. Adesina, A. I. Beyer, et al. 2015. “Inflammatory and Cardiac Biomarkers Are Differentially Expressed in Clinical Stages of Chagas Disease.” *International Journal of Cardiology* 199 (September): 451–59. <https://doi.org/10.1016/j.ijcard.2015.07.040>.
- Kim, Dae Hwan, So Young Chun, Eun Hye Lee, Bomi Kim, Bo Hyun Yoon, Haejung Gil, Man Hoon Han, et al. 2021. “IL-10 Deficiency Aggravates Renal Inflammation, Fibrosis and Functional Failure in High-Fat Dieted Obese Mice.” *Tissue Engineering and Regenerative Medicine* 18 (3): 399–410. <https://doi.org/10.1007/s13770-020-00328-7>.

- Kim, In Soo, Prashanta Silwal, and Eun-Kyeong Jo. 2023. "Peroxisome Proliferator-Activated Receptor-Targeted Therapies: Challenges upon Infectious Diseases." *Cells* 12 (4): 1–18. <https://doi.org/10.3390/cells12040650>.
- Korn, Thomas, Estelle Bettelli, Mohamed Oukka, and Vijay K. Kuchroo. 2009. "IL-17 and Th17 Cells." *Annual Review of Immunology* 27 (1): 485–517. <https://doi.org/10.1146/annurev.immunol.021908.132710>.
- Kransdorf, Evan P., Phillip C. Zakowski, and Jon A. Kobashigawa. 2014. "Chagas Disease in Solid Organ and Heart Transplantation." *Current Opinion in Infectious Diseases* 27 (5): 418–24. <https://doi.org/10.1097/QCO.0000000000000088>.
- Krishnamurthy, Prasanna. 2011. "IL-10 Deficiency Impairs Bone Marrow-Derived Endothelial Progenitor Cell (EPC) Survival and Function in Ischemic Myocardium." *Circulation Research* 109 (11): 1280–89. <https://doi.org/doi:10.1161/CIRCRESAHA.111.248369>. IL-10.
- Kühn, Ralf, Jürgen Löhler, Donna Rennick, Klaus Rajewsky, and Werner Müller. 1993. "Interleukin-10-Deficient Mice Develop Chronic Enterocolitis." *Cell* 75 (2): 263–74. [https://doi.org/10.1016/0092-8674\(93\)80068-P](https://doi.org/10.1016/0092-8674(93)80068-P).
- Lawrence, Toby, and Gioacchino Natoli. 2011. "Transcriptional Regulation of Macrophage Polarization: Enabling Diversity with Identity." *Nature Reviews Immunology* 11 (11): 750–61. <https://doi.org/10.1038/nri3088>.
- Lee, Jimmy W., Poonam J. Bajwa, Monica J. Carson, Daniel R. Jeske, Yingzi Cong, Charles O. Elson, Christian Lytle, and Daniel S. Straus. 2007. "Fenofibrate Represses Interleukin-17 and Interferon- γ Expression and Improves Colitis in Interleukin-10-Deficient Mice." *Gastroenterology* 133 (1): 108–23. <https://doi.org/10.1053/J.GASTRO.2007.03.113>.
- Lewis, Michael D, Amanda Fortes Francisco, Martin C Taylor, Hollie Burrell-Saward, Alex P McLatchie, Michael A Miles, and John M Kelly. 2014. "Bioluminescence Imaging of Chronic Trypanosoma Cruzi Infections Reveals Tissue-Specific Parasite Dynamics and Heart Disease in the Absence of Locally Persistent Infection." *Cellular Microbiology*, April. <https://doi.org/10.1111/cmi.12297>.
- Li, Ping, Shike Luo, Chunji Pan, and Xiaoshu Cheng. 2015. "Modulation of Fatty Acid Metabolism Is Involved in the Alleviation of Isoproterenol-Induced Rat Heart Failure by Fenofibrate." *Molecular Medicine Reports* 12 (6): 7899–7906.

- <https://doi.org/10.3892/mmr.2015.4466>.
- Ling, Hua, John T Luoma, and Daniel Hilleman. 2013. "A Review of Currently Available Fenofibrate and Fenofibric Acid Formulations." *Review Cardiol Res* 4 (2): 47–55. <https://doi.org/10.4021/cr270w>.
- Liu, Chao, Dewei Chu, Kourosh Kalantar-Zadeh, Jacob George, Howard A. Young, and Guozhen Liu. 2021. "Cytokines: From Clinical Significance to Quantification." *Advanced Science* 8 (15). <https://doi.org/10.1002/advs.202004433>.
- Macaluso, Giusi, Francesca Grippi, Santina Di Bella, Valeria Blanda, Francesca Gucciardi, Alessandra Torina, Annalisa Guercio, and Vincenza Cannella. 2023. "A Review on the Immunological Response against Trypanosoma Cruzi." *Pathogens* 12 (2). <https://doi.org/10.3390/pathogens12020282>.
- Machado, F, L Jelicks, L Kirchhoff, J Shirani, F Nagajyothi, S Mukherjee, Randin Nelson, et al. 2012a. "Chagas Heart Disease: Report on Recent Developments." *Cardiol Rev* 20 (2): 53–65. <https://doi.org/10.1097/CRD.0b013e31823efde2.Chagas>.
- Machado, Fabiana S., Walderez O. Dutra, Lisia Esper, Kenneth J. Gollob, Mauro M. Teixeira, Stephen M. Factor, Louis M. Weiss, Fnu Nagajyothi, Herbert B. Tanowitz, and Nisha J. Garg. 2012b. "Current Understanding of Immunity to Trypanosoma Cruzi Infection and Pathogenesis of Chagas Disease." *Seminars in Immunopathology*. Springer-Verlag. <https://doi.org/10.1007/s00281-012-0351-7>.
- Magalhães, Luísa M.D., Kenneth J. Gollob, Bianca Zingales, and Walderez O. Dutra. 2022. "Pathogen Diversity, Immunity, and the Fate of Infections: Lessons Learned from Trypanosoma Cruzi Human–Host Interactions." *The Lancet Microbe* 3 (9): e711–22. [https://doi.org/10.1016/S2666-5247\(21\)00265-2](https://doi.org/10.1016/S2666-5247(21)00265-2).
- Maldonado, Edio, Diego A. Rojas, Fabiola Urbina, and Aldo Solari. 2021. "The Oxidative Stress and Chronic Inflammatory Process in Chagas Disease: Role of Exosomes and Contributing Genetic Factors." *Oxidative Medicine and Cellular Longevity* 2021. <https://doi.org/10.1155/2021/4993452>.
- Mantovani, Alberto, Charles A. Dinarello, Martina Molgora, and Cecilia Garlanda. 2019. "Interleukin-1 and Related Cytokines in the Regulation of Inflammation and Immunity." *Immunity* 50 (4): 778–95. <https://doi.org/10.1016/j.immuni.2019.03.012>.
- Marin-Neto, Jose Antonio, Edécio Cunha-Neto, Benedito C. Maciel, and Marcus V.

- Simões. 2007. "Pathogenesis of Chronic Chagas Heart Disease." *Circulation*. Lippincott Williams and Wilkins. <https://doi.org/10.1161/CIRCULATIONAHA.106.624296>.
- Martínez-Díaz, Rafael A., José A Escario, Juan J. Nogal-Ruiz, and Alicia Gómez-Barrio. 2001. "Biological Characterization of Trypanosoma Cruzi Strains." *Memorias Do Instituto Oswaldo Cruz* 96 (1): 53–59. <https://doi.org/10.1590/S0074-02762001000100006>.
- Maya, Juan Diego, Bruce K Cassels, Patricio Iturriaga-Vásquez, Jorge Ferreira, Mario Faúndez, Norbel Galanti, Arturo Ferreira, and Antonio Morello. 2007. "Mode of Action of Natural and Synthetic Drugs against Trypanosoma Cruzi and Their Interaction with the Mammalian Host." *Comparative Biochemistry and Physiology. Part A, Molecular & Integrative Physiology* 146 (4): 601–20. <https://doi.org/10.1016/j.cbpa.2006.03.004>.
- Medzhitov, Ruslan. 2007. "Recognition of Microorganisms and Activation of the Immune Response." *Nature* 449 (7164): 819–26. <https://doi.org/10.1038/nature06246>.
- Meng, Xiao Ming, David J. Nikolic-Paterson, and Hui Yao Lan. 2016. "TGF- β : The Master Regulator of Fibrosis." *Nature Reviews Nephrology* 12 (6): 325–38. <https://doi.org/10.1038/nrneph.2016.48>.
- Mills, Kingston H.G. 2023. "IL-17 and IL-17-Producing Cells in Protection versus Pathology." *Nature Reviews Immunology* 23 (1): 38–54. <https://doi.org/10.1038/s41577-022-00746-9>.
- Miossec, Pierre, and Jay K. Kolls. 2012. "Targeting IL-17 and T H 17 Cells in Chronic Inflammation." *Nature Reviews Drug Discovery* 11 (10): 763–76. <https://doi.org/10.1038/nrd3794>.
- Mirkin, G A, A M Celentano, E L Malchiodi, M Jones, and S M González Cappa. 1997. "Different Trypanosoma Cruzi Strains Promote Neuromyopathic Damage Mediated by Distinct T Lymphocyte Subsets." *Clinical and Experimental Immunology* 107 (2): 328–34. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9030871>.
- Monge-Maillo, B., and R. López-Vélez. 2017. "Challenges in the Management of Chagas Disease in Latin-American Migrants in Europe." *Clinical Microbiology and Infection* 23 (5): 290–95. <https://doi.org/10.1016/j.cmi.2017.04.013>.

- Morikawa, Masato, Rik Derynck, and Kohei Miyazono. 2016. "TGF- β and the TGF- β Family: Context-Dependent Roles in Cell and Tissue Physiology." *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology* 8 (5). <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a021873>.
- Morillo, Carlos A., Jose Antonio Marin-Neto, Alvaro Avezum, Sergio Sosa-Estani, Anis Rassi, Fernando Rosas, Erick Villena, et al. 2015. "Randomized Trial of Benznidazole for Chronic Chagas' Cardiomyopathy." *New England Journal of Medicine* 373 (14): 1295–1306. <https://doi.org/10.1056/NEJMoa1507574>.
- Mosmann, Tim R., James J. Kobie, F. Eun Hyung Lee, and Sally A. Quataert. 2009. "T Helper Cytokine Patterns: Defined Subsets, Random Expression, and External Modulation." *Immunologic Research* 45 (2–3): 173–84. <https://doi.org/10.1007/s12026-009-8098-5>.
- Mosser, David M. Zhang Xia. 2008. "Interleukin-10: New Perspectives on an Old Cytokine." *Immunological Reviews*, 205–18. <https://doi.org/10.1111/j.1600-065X.2008.00706.x>.
- Muller, L A, N Añasco, and S M González Cappa. 1986. "Trypanosoma Cruzi: Isolate Dependence in the Induction of Lytic Antibodies in the Mouse and Rabbit." *Experimental Parasitology* 61 (3): 284–93. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/3086113>.
- Murray, Peter J., Judith E. Allen, Subhra K. Biswas, Edward A. Fisher, Derek W. Gilroy, Sergij Goerdt, Siamon Gordon, et al. 2014. "Macrophage Activation and Polarization: Nomenclature and Experimental Guidelines." *Immunity* 41 (1): 14–20. <https://doi.org/10.1016/j.immuni.2014.06.008>.
- Nardy, AF, Freire-De-Lima CG, and A Morrot. 2015. "Immune Evasion Strategies of Trypanosoma Cruzi." *Journal of Immunology Research* 2015. <https://doi.org/10.1155/2015/178947>.
- NCI Thesaurus. NIH. 2017. "Fenofibrate (Code C29047)." 2017. https://ncit.nci.nih.gov/ncitbrowser/ConceptReport.jsp?dictionary=NCI_Thesaurus&ns=NCI_Thesaurus&code=C29047.
- Nielsen, Ronni, Lars Grøntved, Hendrik G. Stunnenberg, and Susanne Mandrup. 2006. "Peroxisome Proliferator-Activated Receptor Subtype- and Cell-Type-Specific Activation of Genomic Target Genes upon Adenoviral Transgene Delivery."

- Molecular and Cellular Biology* 26 (15): 5698–5714.
<https://doi.org/10.1128/mcb.02266-05>.
- Nisimura, Lindice Mitie, Roberto Rodrigues Ferreira, Laura Lacerda Coelho, Gabriel Melo de Oliveira, Beatriz Matheus Gonzaga, Marcelo Meuser-Batista, Joseli Lannes-Vieira, Tania Araujo-Jorge, and Luciana Ribeiro Garzoni. 2023. “Vascular Growth Factor Inhibition with Bevacizumab Improves Cardiac Electrical Alterations and Fibrosis in Experimental Acute Chagas Disease.” *Biology* 12 (11): 1414. <https://doi.org/10.3390/biology12111414>.
- Nogueira De Melo. 2004. “Reduced Activity of Matrix Metalloproteinase-9 in Trypanosoma Cruzi- Infected Mouse Embryo Hepatocyte Cell.” *Hepatology Research* 28: 49–56. <https://doi.org/10.1016/j.hepres.2003.09.002>.
- Nunes, João Paulo Silva, Pauline Andrieux, Pauline Brochet, Rafael Ribeiro Almeida, Eduardo Kitano, André Kenji Honda, Leo Kei Iwai, et al. 2021. “Co-Exposure of Cardiomyocytes to IFN- γ and TNF- α Induces Mitochondrial Dysfunction and Nitro-Oxidative Stress: Implications for the Pathogenesis of Chronic Chagas Disease Cardiomyopathy.” *Frontiers in Immunology* 12 (November): 1–19. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2021.755862>.
- Nunes, Maria Carmo Pereira, Wistremundo Dones, Carlos A. Morillo, Juan Justiniano Encina, and Antônio Luiz Ribeiro. 2013. “Chagas Disease: An Overview of Clinical and Epidemiological Aspects.” *Journal of the American College of Cardiology* 62 (9): 767–76. <https://doi.org/10.1016/j.jacc.2013.05.046>.
- Osada, Y., Y. Horie, S. Nakae, K. Sudo, and T. Kanazawa. 2019. “STAT6 and IL-10 Are Required for the Anti-Arthritic Effects of *Schistosoma Mansoni* via Different Mechanisms.” *Clinical & Experimental Immunology* 195 (1): 109–20. <https://doi.org/10.1111/cei.13214>.
- Osada, Yoshio, Tomohiro Fujiyama, Naoto Kamimura, Tsukushi Kaji, Susumu Nakae, Katsuko Sudo, Kenji Ishiwata, and Tamotsu Kanazawa. 2017. “Dual Genetic Absence of STAT6 and IL-10 Does Not Abrogate Anti-Hyperglycemic Effects of *Schistosoma Mansoni* in Streptozotocin-Treated Diabetic Mice.” *Experimental Parasitology* 177: 1–12. <https://doi.org/10.1016/j.exppara.2017.03.008>.
- Ouyang, Wenjun, and Anne O’Garra. 2019. “IL-10 Family Cytokines IL-10 and IL-22: From Basic Science to Clinical Translation.” *Immunity* 50 (4): 871–91.

- <https://doi.org/10.1016/J.IMMUNI.2019.03.020>.
- Ouyang, Wenjun, Sascha Rutz, Natasha K. Crellin, Patricia A. Valdez, and Sarah G. Hymowitz. 2011. "Regulation and Functions of the IL-10 Family of Cytokines in Inflammation and Disease." *Annual Review of Immunology* 29: 71–109. <https://doi.org/10.1146/annurev-immunol-031210-101312>.
- Pautz, Andrea, Julia Art, Susanne Hahn, Sebastian Nowag, Cornelia Voss, and Hartmut Kleinert. 2010. "Regulation of the Expression of Inducible Nitric Oxide Synthase." *Nitric Oxide - Biology and Chemistry* 23 (2): 75–93. <https://doi.org/10.1016/j.niox.2010.04.007>.
- Pazienza, Valerio, Manlio Vinciguerra, and Gianluigi Mazzocchi. 2012. "PPARs Signaling and Cancer in the Gastrointestinal System." *PPAR Research*, 1–10. <https://doi.org/10.1155/2012/560846>.
- Penas, Federico, Gerardo A. Mirkin, Eugenia Hovsepian, Ágata Cevey, Roberto Caccuri, María Elena Sales, and Nora B. Goren. 2013. "PPAR γ Ligand Treatment Inhibits Cardiac Inflammatory Mediators Induced by Infection with Different Lethality Strains of *Trypanosoma Cruzi*." *Biochimica et Biophysica Acta - Molecular Basis of Disease* 1832 (1): 239–48. <https://doi.org/10.1016/j.bbadis.2012.08.007>.
- Penas, Federico, Gerardo A. Mirkin, Marcela Vera, Ágata Carolina Cevey, Cintia D. González, Marisa I. Gómez, María Elena Sales, and Nora B. Goren. 2015. "Treatment in Vitro with PPAR α and PPAR γ Ligands Drives M1-to-M2 Polarization of Macrophages from T. Cruzi-Infected Mice." *Biochimica et Biophysica Acta* 1852 (5): 893–904. <https://doi.org/10.1016/j.bbadis.2014.12.019>.
- Penas, Federico Nicolás, Ágata Carolina Cevey, Sofía Siffo, Gerardo Ariel Mirkin, and Nora Beatriz Goren. 2016. "Hepatic Injury Associated with *Trypanosoma Cruzi* Infection Is Attenuated by Treatment with 15-Deoxy- $\Delta^{12,14}$ prostaglandin J2." *Experimental Parasitology* 170: 100–108. <https://doi.org/10.1016/j.exppara.2016.09.015>.
- Pereira, Isabela Resende, Glaucia Vilar-Pereira, Andrea Alice Silva, Otacilio Cruz Moreira, Constança Britto, Ellen Diana Marinho Sarmento, and Joseli Lannes-Vieira. 2014. "Tumor Necrosis Factor Is a Therapeutic Target for Immunological Unbalance and Cardiac Abnormalities in Chronic Experimental Chagas' Heart Disease." *Mediators of Inflammation* 2014.

- <https://doi.org/10.1155/2014/798078>.
- Pérez-Molina, José A., and Israel Molina. 2018. "Chagas Disease." *The Lancet*. Lancet Publishing Group. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(17\)31612-4](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(17)31612-4).
- Pieralisi, Azul V., Ágata C. Cevey, Federico N. Penas, Nilda Prado, Ana Mori, Mónica Gili, Gerardo A. Mirkin, Juan Gagliardi, and Nora B. Goren. 2022. "Fenofibrate Increases the Population of Non-Classical Monocytes in Asymptomatic Chagas Disease Patients and Modulates Inflammatory Cytokines in PBMC." *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology* 11 (March): 1–15. <https://doi.org/10.3389/fcimb.2021.785166>.
- Pino-Martínez, Agustina M., Cristian G. Miranda, Estela I. Batalla, Stella M. González-Cappa, and Catalina D. Alba Soto. 2019. "IL-10 Participates in the Expansion and Functional Activation of CD8 + T Cells during Acute Infection with *Trypanosoma Cruzi*." *Journal of Leukocyte Biology* 105 (1): 163–75. <https://doi.org/10.1002/JLB.3A0318-111RR>.
- Rada, Jimena, Martín Donato, Federico N. Penas, Catalina Alba Soto, Ágata C. Cevey, Azul V. Pieralisi, Ricardo Gelpi, Gerardo A. Mirkin, and Nora B. Goren. 2020. "IL-10-Dependent and -Independent Mechanisms Are Involved in the Cardiac Pathology Modulation Mediated by Fenofibrate in an Experimental Model of Chagas Heart Disease." *Frontiers in Immunology* 11: 1–14. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2020.572178>.
- Rassi, Anis, Anis Rassi, and José Antonio Marin-Neto. 2010. "Chagas Disease." *The Lancet*, 1388–1402. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(10\)60061-X](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(10)60061-X).
- Rassi, Anis, Anis Rassi, and Sérgio G. Rassi. 2007. "Predictors of Mortality in Chronic Chagas Disease: A Systematic Review of Observational Studies." *Circulation*. <https://doi.org/10.1161/CIRCULATIONAHA.106.627265>.
- Revollo, Susana, Bruno Oury, Jean-pierre Laurent, Christian Barnabe, Virginie Quesney, and Michel Tibayrenc. 1998. "Trypanosoma Cruzi : Impact of Clonal Evolution of the Parasite on Its Biological and Medical Properties." *Experimental Parasitology* 39 (89): 30–39.
- Ribeiro, Antonio L, Maria P Nunes, Mauro M Teixeira, and Manoel Rocha. 2012. "Diagnosis and Management of Chagas Disease and Cardiomyopathy." *Nature Reviews Cardiology*, no. 10 (October): 576–89.

- <https://doi.org/10.1038/nrcardio.2012.109>.
- Roffê, Ester, Antonio Gigliotti Rothfuchs, Helton C Santiago, Ana Paula M P Marino, Flavia L Ribeiro-Gomes, Michael Eckhaus, Lis R V Antonelli, and Philip M Murphy. 2012. "IL-10 Limits Parasite Burden and Protects against Fatal Myocarditis in a Mouse Model of Trypanosoma Cruzi Infection." *Journal of Immunology (Baltimore, Md. : 1950)* 188 (2): 649–60. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.1003845>.
- Roman-Campos, Danilo, Hugo Leonardo L. Duarte, Policarpo A. Sales, Antonio J. Natali, Catherine Ropert, Ricardo T. Gazzinelli, and Jader S. Cruz. 2009. "Changes in Cellular Contractility and Cytokines Profile during Trypanosoma Cruzi Infection in Mice." *Basic Research in Cardiology* 104 (3): 238–46. <https://doi.org/10.1007/s00395-009-0776-x>.
- Roszer, Tamás. 2015. "Understanding the Mysterious M2 Macrophage through Activation Markers and Effector Mechanisms." *Mediators of Inflammation* 2015: 16–18. <https://doi.org/10.1155/2015/816460>.
- Roy, Roopali, Gwendolyn Louis, Kevin R. Loughlin, Dmitri Wiederschain, Susan M. Kilroy, Carolyn C. Lamb, David Zurakowski, and Marsha A. Moses. 2008. "Tumor-Specific Urinary Matrix Metalloproteinase Fingerprinting: Identification of High Molecular Weight Urinary Matrix Metalloproteinase Species." *Clinical Cancer Research* 14 (20): 6610–17. <https://doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-08-1136>.
- Roy, Roopali, Bo Zhang, and Marsha A Moses. 2006. "Making the Cut : Protease-Mediated Regulation of Angiogenesis" 312: 608–22. <https://doi.org/10.1016/j.yexcr.2005.11.022>.
- Rutz, Sascha, and Wenjun Ouyang. 2016. "Regulation of Interleukin-10 Expression." *Advances in Experimental Medicine and Biology* 941 (II): 89–116. https://doi.org/10.1007/978-94-024-0921-5_5.
- Sahn, D J, A DeMaria, J Kisslo, and A Weyman. 1978. "Recommendations Regarding Quantitation in M-Mode Echocardiography: Results of a Survey of Echocardiographic Measurements." *Circulation*, no. 6 (December): 1072–83. <https://doi.org/10.1161/01.CIR.58.6.1072>.
- Sanmarco, Liliana Maria, Natalia Eberhardt, Nicolás Eric Ponce, Roxana Carolina Cano, Gustavo Bonacci, and Maria Pilar Aoki. 2018. "New Insights into the

- Immunobiology of Mononuclear Phagocytic Cells and Their Relevance to the Pathogenesis of Cardiovascular Diseases.” *Frontiers in Immunology*. Frontiers Media S.A. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2017.01921>.
- Sanoja, Cristina, Sofía Carbajosa, Manuel Fresno, Núria Gironès, and L Puig. 2013. “Analysis of the Dynamics of Infiltrating CD4+ T Cell Subsets in the Heart during Experimental Trypanosoma Cruzi Infection.” Edited by Herbert B. Tanowitz. *PLoS ONE* 8 (6): e65820. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0065820>.
- Santos-Miranda, Artur, Julliane Vasconcelos Joviano-Santos, Grazielle Alves Ribeiro, Ana Flávia M. Botelho, Peter Rocha, Leda Quercia Vieira, Jader Santos Cruz, and Danilo Roman-Campos. 2020. “Reactive Oxygen Species and Nitric Oxide Imbalances Lead to in Vivo and in Vitro Arrhythmogenic Phenotype in Acute Phase of Experimental Chagas Disease.” *PLoS Pathogens* 16 (3): 1–27. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1008379>.
- Saraiva, Margarida, and Anne O’Garra. 2010. “The Regulation of IL-10 Production by Immune Cells.” *Nature Reviews Immunology*. <https://doi.org/10.1038/nri2711>.
- Saraiva, Margarida, Paulo Vieira, and Anne O’Garra. 2020. “Biology and Therapeutic Potential of Interleukin-10.” *Journal of Experimental Medicine* 217 (1): 1–19. https://doi.org/10.1084/jem_20190418.
- Schmittgen, Thomas D, and Kenneth J Livak. 2008. “Analyzing Real-Time PCR Data by the Comparative C(T) Method.” *Nature Protocols* 3 (6): 1101–8. <https://doi.org/10.1038/nprot.2008.73>.
- Schmunis, Gabriel A., and Jose R. Cruz. 2005. “Safety of the Blood Supply in Latin America.” *Clinical Microbiology Reviews* 18 (1): 12–29. <https://doi.org/10.1128/CMR.18.1.12-29.2005>.
- Schmunis, Gabriel A., and Zaida E. Yadon. 2010. “Chagas Disease: A Latin American Health Problem Becoming a World Health Problem.” *Nature*, no. 7301: 6–7. <https://doi.org/10.1016/j.actatropica.2009.11.003>.
- Sehrawat, Sharvan, and Barry T. Rouse. 2017. “Interplay of Regulatory T Cell and Th17 Cells during Infectious Diseases in Humans and Animals.” *Frontiers in Immunology* 8 (APR): 1–14. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2017.00341>.
- Shapouri-Moghaddam, Abbas, Saeed Mohammadian, Hossein Vazini, Mahdi Taghadosi, Seyed Alireza Esmaeili, Fatemeh Mardani, Bitá Seifi, Asadollah

- Mohammadi, Jalil T. Afshari, and Amirhossein Sahebkar. 2018. *Macrophage Plasticity, Polarization, and Function in Health and Disease. Journal of Cellular Physiology*. Vol. 233. <https://doi.org/10.1002/jcp.26429>.
- Shikanai-Yasuda, Maria Aparecida, and Noemia Barbosa Carvalho. 2012. "Oral Transmission of Chagas Disease." *Clinical Infectious Diseases* 54 (6): 845–52. <https://doi.org/10.1093/cid/cir956>.
- Silva, Nadjanía Saraiva de Lira, Cristina Mary Orikaza, Fabiana Rodrigues de Santana, Luana Aguiar dos Santos, Bruno Ramos Salu, Maria Luiza Vilela Oliva, Rita de Cássia Sinigaglia, and Renato Arruda Mortara. 2021. "Interleukin-9 in Immunopathology of Trypanosoma Cruzi Experimental Infection." *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology* 11 (October): 1–15. <https://doi.org/10.3389/fcimb.2021.756521>.
- Sivasubramanian, Natarajan, Mytsi L. Coker, Karla M. Kurrelmeyer, William R. MacLellan, Francesco J. DeMayo, Francis G. Spinale, and Douglas L. Mann. 2001. "Left Ventricular Remodeling in Transgenic Mice with Cardiac Restricted Overexpression of Tumor Necrosis Factor." *Circulation* 104 (7): 826–31. <https://doi.org/10.1161/hc3401.093154>.
- Sociedad Argentina de Protozoología. 2016. "Sociedad Argentina de Protozoología." *Libro de Resúmenes XXVIII Reunión Anual de La Sociedad Argentina de Protozoología y Enfermedades Parasitarias - SIMPOSIO Internacional de Biología Celular y Molecular de La Enfermedad de Chagas*.
- Sousa, Giovane R., Juliana A.S. Gomes, Marcos Paulo S. Damasio, Maria Carmo P. Nunes, Henrique S. Costa, Nayara I. Medeiros, Rafaelle C.G. Fares, Ana Thereza Chaves, Rodrigo Corrêa-Oliveira, and Manoel Otávio C. Rocha. 2017. "The Role of Interleukin 17-Mediated Immune Response in Chagas Disease: High Level Is Correlated with Better Left Ventricular Function." *PLoS ONE* 12 (3). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0172833>.
- Spangler, Jamie B., Ignacio Moraga, Juan L. Mendoza, and K. Christopher Garcia. 2015. "Insights into Cytokine-Receptor Interactions from Cytokine Engineering." *Annual Review of Immunology* 33 (12): 139–67. <https://doi.org/10.1146/annurev-immunol-032713-120211>.
- Specker, Gabriela, Damián Estrada, Rafael Radi, and Lucía Piacenza. 2022.

- “Trypanosoma Cruzi Mitochondrial Peroxiredoxin Promotes Infectivity in Macrophages and Attenuates Nifurtimox Toxicity.” *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology* 12 (February): 749476. <https://doi.org/10.3389/fcimb.2022.749476>.
- Stienstra, Rinke, Stéphane Mandard, David Patsouris, Cathy Maass, Sander Kersten, and Michael Müller. 2007. “Peroxisome Proliferator-Activated Receptor α Protects against Obesity-Induced Hepatic Inflammation.” *Endocrinology* 148 (6): 2753–63. <https://doi.org/10.1210/en.2007-0014>.
- Stijlemans, Benoit, Maxime Schoovaerts, Patrick De Baetselier, Stefan Magez, and Carl De Trez. 2022. “The Role of MIF and IL-10 as Molecular Yin-Yang in the Modulation of the Host Immune Microenvironment During Infections: African Trypanosome Infections as a Paradigm.” *Frontiers in Immunology* 13 (April): 1–21. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2022.865395>.
- Sun, Licheng, Jinrong Fu, and Yufeng Zhou. 2017. “Metabolism Controls the Balance of Th17/T-Regulatory Cells.” *Frontiers in Immunology* 8 (NOV): 1–12. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2017.01632>.
- Takada, Ichiro, and Makoto Makishima. 2020. “Peroxisome Proliferator-Activated Receptor Agonists and Antagonists: A Patent Review (2014-Present).” *Expert Opinion on Therapeutic Patents* 30 (1): 1–13. <https://doi.org/10.1080/13543776.2020.1703952>.
- Tanaka, Toshio, Masashi Narazaki, and Tadamitsu Kishimoto. 2014. “IL-6 in Inflammation, Immunity and Disease.” *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology* 6: 1–16.
- Tanowitz, Herbert B, Fabiana S Machado, David C Spray, Joel M Friedman, Oren S Weiss, Jose N Lora, Jyothi Nagajyothi, et al. 2015. “Developments in the Management of Chagas Cardiomyopathy.” *Expert Review of Cardiovascular Therapy* 13 (12): 1393–1409. <https://doi.org/10.1586/14779072.2015.1103648>.
- Tarleton, Rick L. 2001. “Parasite Persistence in the Aetiology of Chagas Disease.” In *International Journal for Parasitology*, 31:550–54. Elsevier Ltd. [https://doi.org/10.1016/S0020-7519\(01\)00158-8](https://doi.org/10.1016/S0020-7519(01)00158-8).
- Teixeira, Mauro M, Ricardo T Gazzinelli, and João S Silva. 2002. “Chemokines, Inflammation and Trypanosoma Cruzi Infection.” *Trends in Parasitology* 18 (6):

- 262–65. [https://doi.org/10.1016/s1471-4922\(02\)02283-3](https://doi.org/10.1016/s1471-4922(02)02283-3).
- Trachtenberg, Barry H., and Joshua M. Hare. 2017. “Inflammatory Cardiomyopathic Syndromes.” *Circulation Research* 121 (7): 803–18. <https://doi.org/10.1161/CIRCRESAHA.117.310221>.
- Traina, Mahmoud, Sheba Meymandi, and Jason S. Bradfield. 2016. “Heart Failure Secondary to Chagas Disease: An Emerging Problem in Non-Endemic Areas.” *Current Heart Failure Reports*, no. 6 (December): 295–301. <https://doi.org/10.1007/s11897-016-0305-9>.
- Varfolomeev, Eugene, and Domagoj Vucic. 2018. “Intracellular Regulation of TNF Activity in Health and Disease.” *Cytokine* 101: 26–32. <https://doi.org/10.1016/j.cyto.2016.08.035>.
- Vilar-Pereira, Glaucia, Isabela Resende Pereira, Leonardo Alexandre de Souza Ruivo, Otacilio Cruz Moreira, Andrea Alice da Silva, Constança Britto, and Joseli Lannes-Vieira. 2016. “Combination Chemotherapy with Suboptimal Doses of Benznidazole and Pentoxifylline Sustains Partial Reversion of Experimental Chagas’ Heart Disease.” *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, no. 7 (July): 4297–4309. <https://doi.org/10.1128/AAC.02123-15>.
- Vitelli-Avelar, Danielle Marquete, Renato Sathler-Avelar, Armanda Moreira Mattoso-Barbosa, Nicolas Gouin, Marcelo Perdigo-de-Oliveira, Leydiane Valério-dos-Reis, Ronaldo Peres Costa, et al. 2017. “Cynomolgus Macaques Naturally Infected with Trypanosoma Cruzi-I Exhibit an Overall Mixed pro-Inflammatory/Modulated Cytokine Signature Characteristic of Human Chagas Disease.” *PLoS Neglected Tropical Diseases* 11 (2): 1–18. <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0005233>.
- Vitt, J. P., A. B. Saunders, M. T. O’Brien, J. Mansell, D. K. Ajithdoss, and S. A. Hamer. 2016. “Diagnostic Features of Acute Chagas Myocarditis with Sudden Death in a Family of Boxer Dogs.” *Journal of Veterinary Internal Medicine*, no. 4: 1210–15. <https://doi.org/10.1111/jvim.13967>.
- Wang, Lin, Yin Cai, Liguang Jian, Chi Wai Cheung, Liangqing Zhang, and Zhengyuan Xia. 2021. “Impact of Peroxisome Proliferator-Activated Receptor- α on Diabetic Cardiomyopathy.” *Cardiovascular Diabetology* 20 (1): 1–15. <https://doi.org/10.1186/s12933-020-01188-0>.
- Wang, Ying, Lingling Fan, Xiangda Meng, Feng Jiang, Qingzhong Chen, Zhuhong Zhang,

- and Hua Yan. 2016. "Transplantation of IL-10-Transfected Endothelial Progenitor Cells Improves Retinal Vascular Repair via Suppressing Inflammation in Diabetic Rats." *Graefe's Archive for Clinical and Experimental Ophthalmology* 254 (10): 1957–65. <https://doi.org/10.1007/s00417-016-3427-6>.
- Weaver, Casey T., and Robin D. Hatton. 2009. "Interplay between the TH 17 and TReg Cell Lineages: A (Co-)Evolutionary Perspective." *Nature Reviews Immunology* 9 (12): 883–89. <https://doi.org/10.1038/nri2660>.
- Wesley, Moisés, Aline Moraes, Ana de Cássia Rosa, Juliana Lott Carvalho, Tatiana Shiroma, Tamires Vital, Nayra Dias, et al. 2019a. "Correlation of Parasite Burden, KDNA Integration, Autoreactive Antibodies, and Cytokine Pattern in the Pathophysiology of Chagas Disease." *Frontiers in Microbiology* 10: 1856. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2019.01856>.
- Frontiers in Microbiology* 10 (AUG): 1856. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2019.01856>.
- Wilson, Arthur, Jose Rodrigues, Yarlla Loyane, Lira Braga, Beatriz Aquino Silva, Amanda Borges Lamounier, Bárbara Oliveira Silva, et al. 2019. "Cardiac Chagas Disease : MMPs , TIMPs , Galectins , and TGF- β as Tissue Remodelling Players." *Disease Markers* 25.
- Yamamoto, Kazuhiro, David Wilkinson, and George Bou-Gharios. 2021. "Targeting Dysregulation of Metalloproteinase Activity in Osteoarthritis." *Calcified Tissue International* 109 (3): 277–90. <https://doi.org/10.1007/s00223-020-00739-7>.
- Zeng, Si Yu, Hui Qin Lu, Qiu Jiang Yan, and Jian Zou. 2018. "A Reduction in ADAM17 Expression Is Involved in the Protective Effect of the PPAR- α Activator Fenofibrate on Pressure Overload-Induced Cardiac Hypertrophy." *PPAR Research* 2018. <https://doi.org/10.1155/2018/7916953>.
- Zhang, J., Y. Cheng, J. Gu, S. Wang, S. Zhou, Y. Wang, Y. Tan, et al. 2016. "Fenofibrate Increases Cardiac Autophagy via FGF21/SIRT1 and Prevents Fibrosis and Inflammation in the Hearts of Type 1 Diabetic Mice." *Clinical Science*, no. 8 (March): 625–41. <https://doi.org/10.1042/CS20150623>.
- Zhou, Zhou, Weiliang Sun, Ying Liang, Yanxiang Gao, Wei Kong, Youfei Guan, Juan Feng, and Xian Wang. 2012. "Fenofibrate Inhibited the Differentiation of T Helper 17 Cells in Vitro." *PPAR Research* 2012: 145654. <https://doi.org/10.1155/2012/145654>.

- Zingales, B, S G Andrade, M R S Briones, D A Campbell, E Chiari, O Fernandes, F Guhl, et al. 2009. "A New Consensus for Trypanosoma Cruzi Intraspecific Nomenclature: Second Revision Meeting Recommends TcI to TcVI." *Memórias Do Instituto Oswaldo Cruz*, no. 7 (November): 1051–54. <https://doi.org/doi.org/10.1590/S0074-02762009000700021>.
- Zingales, Bianca. 2017. "Trypanosoma Cruzi Genetic Diversity: Something New for Something Known about Chagas Disease Manifestations, Serodiagnosis and Drug Sensitivity." *Acta Tropica*, September, 1–15. <https://doi.org/10.1016/j.actatropica.2017.09.017>.
- Zingales, Bianca, Michael A. Miles, David A. Campbell, Michel Tibayrenc, Andrea M. Macedo, Marta M.G. Teixeira, Alejandro G. Schijman, et al. 2012. "The Revised Trypanosoma Cruzi Subspecific Nomenclature: Rationale, Epidemiological Relevance and Research Applications." *Infection, Genetics and Evolution* 12 (2): 240–53. <https://doi.org/10.1016/j.meegid.2011.12.009>.

ANEXO

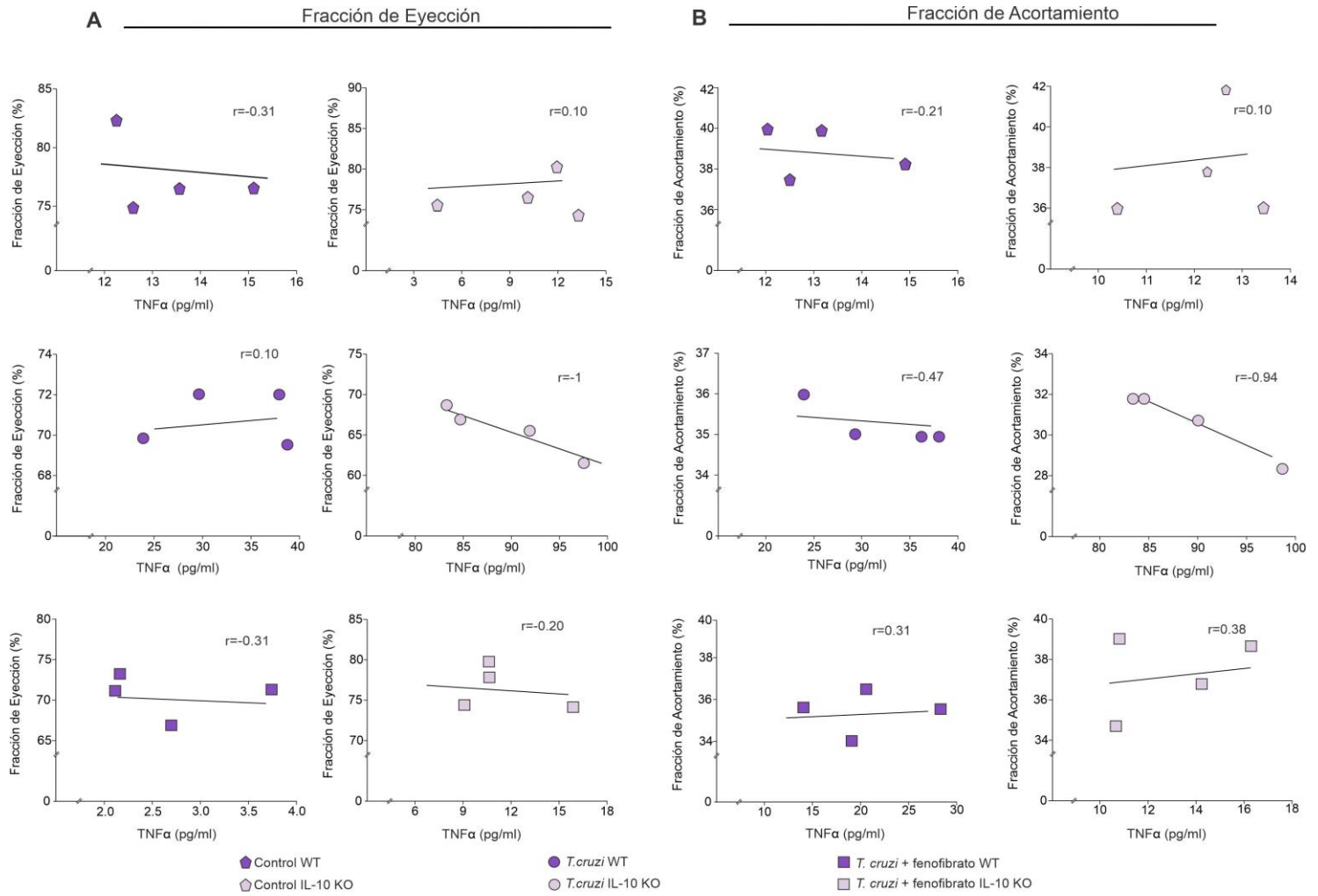


Figura A1: Relación entre disfunción ventricular y nivel de concentración sérica de TNFα. Mediante el test de Correlación de Spearman se determinó la relación entre la fracción de eyección (A) o fracción de acortamiento (B) y el nivel de concentración de TNFα en suero de ratones control (pentágonos, fila superior del gráfico), ratones Tc (círculos, fila intermedia del gráfico) y ratones Tc+F (fila inferior del gráfico, cuadrados), tanto WT (símbolos violeta oscuro) como IL-10 KO (símbolos violeta claro). El coeficiente de correlación está reportado para cada una de las correlaciones.

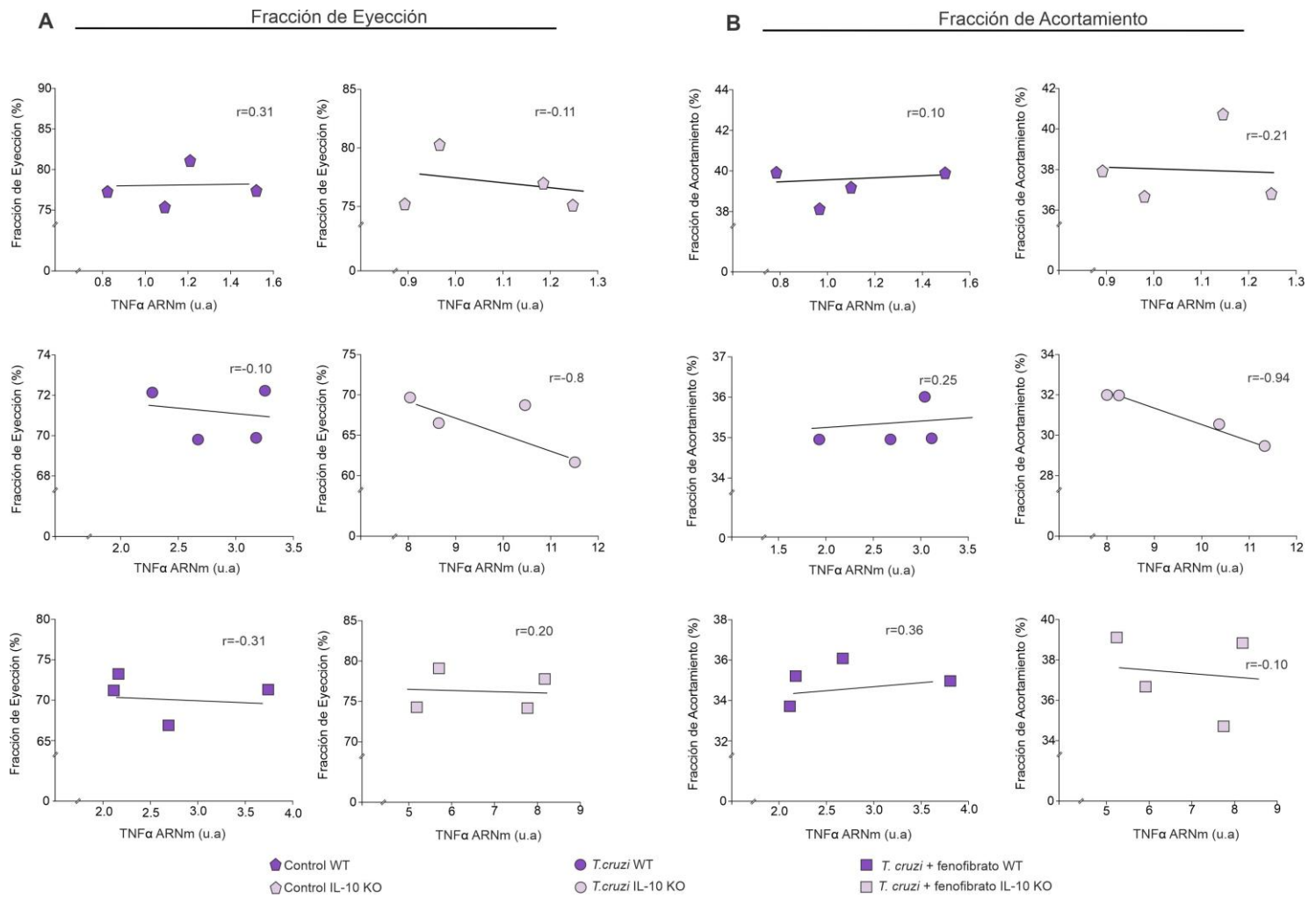


Figura A2: Relación entre disfunción ventricular y nivel de expresión de ANR mensajero de TNF α . Mediante el test de Correlación de Spearman se determinó la relación entre la fracción de eyección (A) o fracción de acortamiento (B) y el nivel de expresión de TNF α en tejido cardíaco de ratones control (pentágonos, fila superior del gráfico), ratones Tc (círculos, fila intermedia del gráfico) y ratones Tc+F (fila inferior del gráfico, cuadrados), tanto WT (símbolos violeta oscuro) como IL-10 KO (símbolos violeta claro). El coeficiente de correlación está reportado para cada una de las correlaciones.

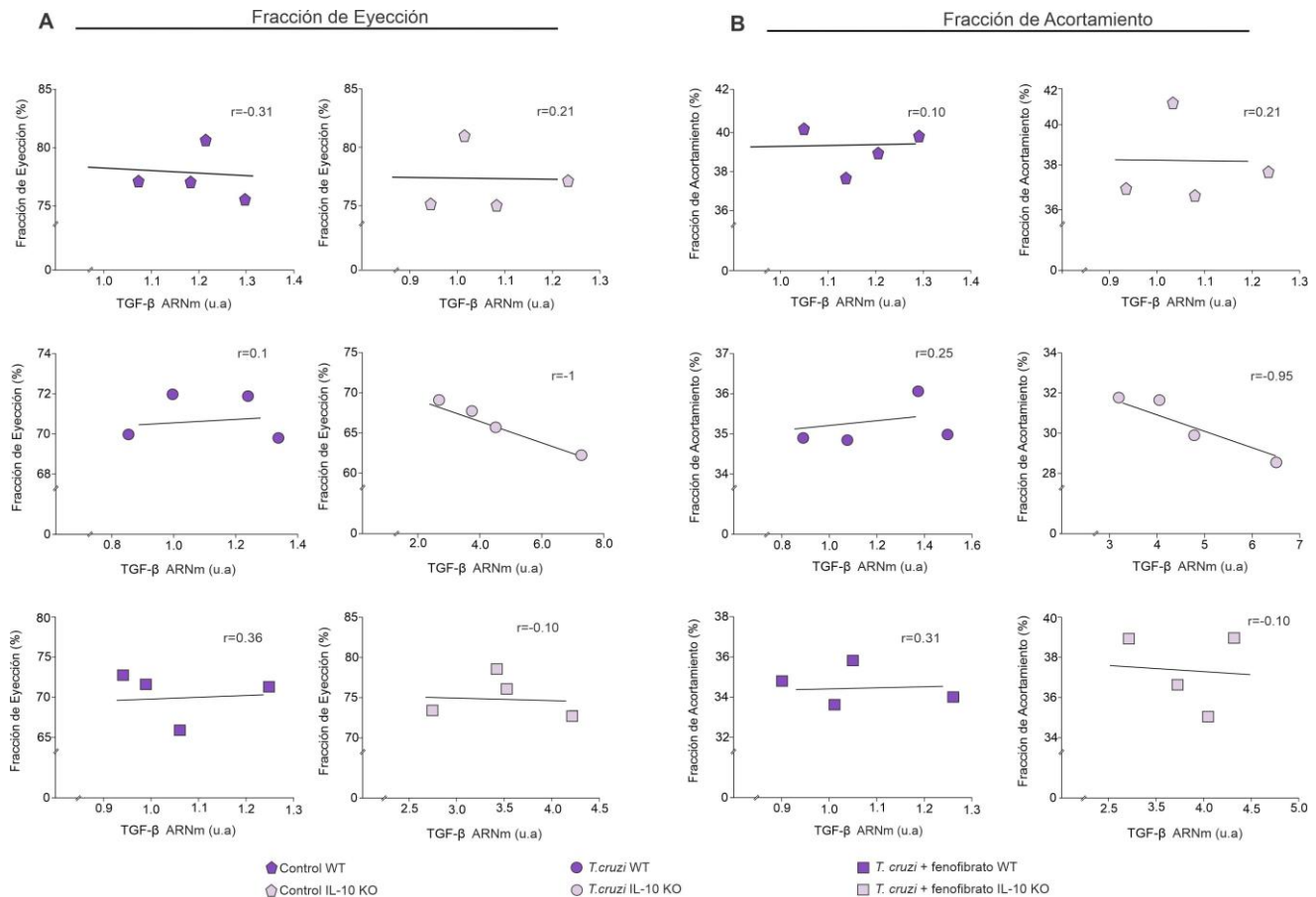


Figura A3: Relación entre disfunción ventricular y nivel de expresión de ARNm de TGF β . Mediante el test de Correlación de Spearman se determinó la relación entre la fracción de eyección (A) o fracción de acortamiento (B) y el nivel de expresión de TGF β en tejido cardíaco de ratones control (pentágonos, fila superior del gráfico), ratones Tc (círculos, fila intermedia del gráfico) y ratones Tc+F (fila inferior del gráfico, cuadrados), tanto WT (símbolos violeta oscuro) como IL-10 KO (símbolos violeta claro). El coeficiente de correlación está reportado para cada una de las correlaciones.

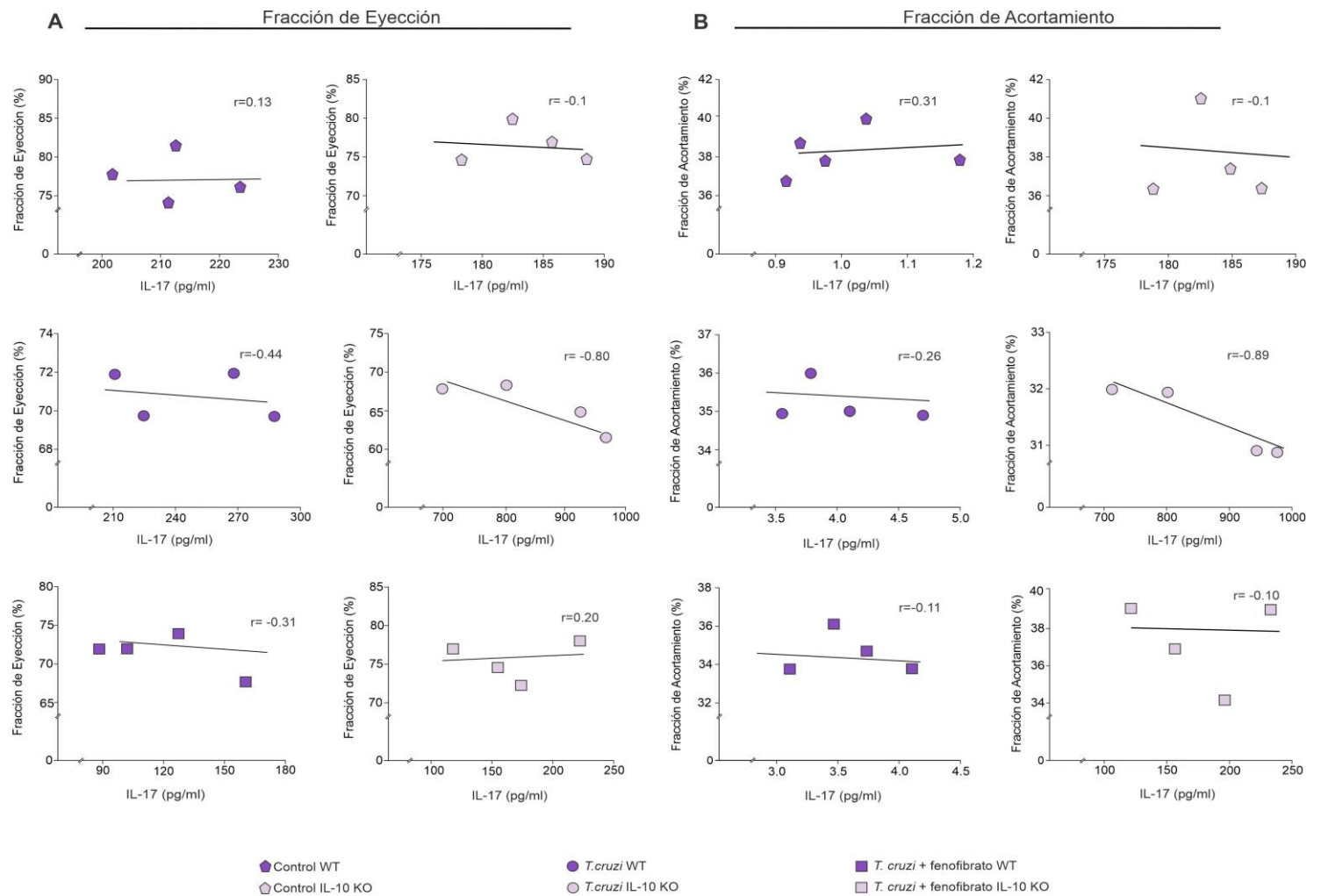


Figura A4: Relación entre disfunción ventricular y nivel de concentración sérica de IL-17. Mediante el test de Correlación de Spearman se determinó la relación entre la fracción de eyección (A) o fracción de acortamiento (B) y el nivel de concentración de IL-17 en suero de ratones control (pentágonos, fila superior del gráfico), ratones Tc (círculos, fila intermedia del gráfico) y ratones Tc+F (fila inferior del gráfico, cuadrados), tanto WT (símbolos violeta oscuro) como IL-10 KO (símbolos violeta claro). El coeficiente de correlación está reportado para cada una de las correlaciones.

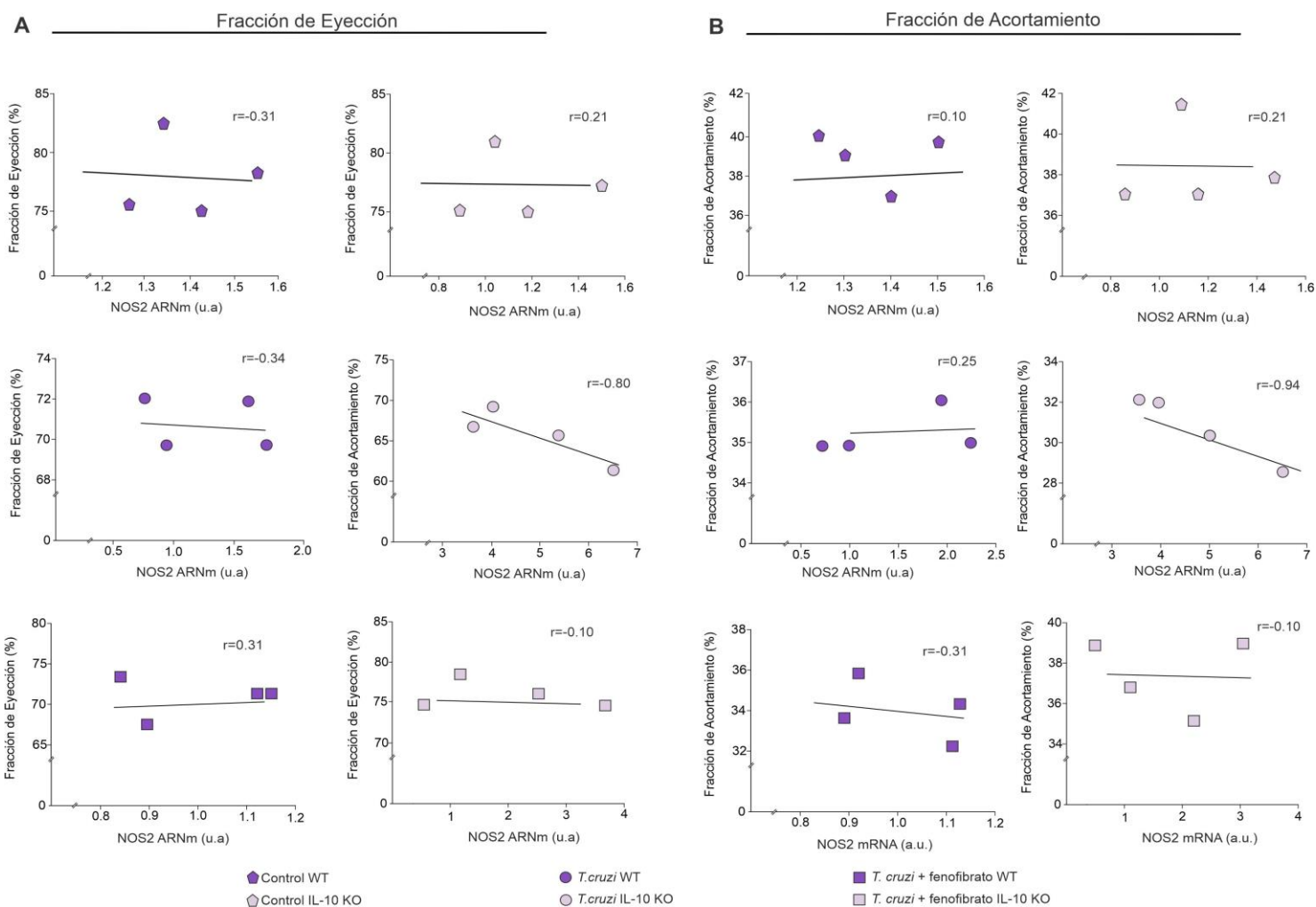


Figura A5 : Relación entre disfunción ventricular y nivel de expresión de ARNm de NOS2. Mediante el test de Correlación de Spearman se determinó la relación entre la fracción de eyección (A) o fracción de acortamiento (B) y el nivel de expresión del ARNm de NOS2 en tejido cardíaco de ratones control (pentágonos, fila superior del gráfico), ratones Tc (círculos, fila intermedia del gráfico) y ratones Tc+F (fila inferior del gráfico, cuadrados), tanto WT (símbolos violeta oscuro) como IL-10 KO (símbolos violeta claro). El coeficiente de correlación está reportado para cada una de las correlaciones.

TABLA DE ABREVIATURAS

µg	Microgramo
µl	Microlitro
µm	Micrometro
ADN	Ácido desoxirribonucleico
ADNc	ADN complementario
ARN	Ácido ribonucleico
ANMAT	Administración Nacional De Medicamentos, Alimentos Y Tecnología Médica
ANOVA	Análisis de la varianza
ARNm	ARN mensajero
ARNr	ARN ribosomal
BSA	Albúmina Sérica Bovina
Ca ²⁺	Calcio
CCC	Cardiomiopatía Chagásica Crónica
CICUAL	Comité Institucional para el Cuidado y Uso de Animales de Laboratorio
CK	Creatina Kinasa
CO ₂	Dióxido de Carbono
CPA	Célula Presentadora de Antígeno
dpi	Días post infección
DNAsa	Deoxiribonucleasa
ERN	Especies Reactivas del Nitrógeno
FA	Fracción de Acortamiento
FE	Fracción de Eyección
Fig.	Figura
Fizz	<i>Resistin like molecule α/ Found in inflammatory zone protein</i>
FOXP3	<i>Forkhead Box P3</i>
gr	Gramos
IFNγ	Interferon gamma
Ig G	Inmunoglobulina G
IL-10	Interleuquina 10
IL-17	Interleuquina 17
IL-2	Interleuquina 2
IL-6	Interleuquina 6
IL-1β	Interleuquina 1 beta
IL-4	Interleuquina 4
IL-13	Interleuquina 13
IL-10R	Receptor de IL-10
iNOS o NOS2	Óxido Nítrico Sintasa inducible
IL-10 KO	Ratones <i>KnockOut</i> para IL-10
kg	Kilogramo
KO	<i>Knock out</i>
LPS	Lipopolisacárido

M1	Macrófago activados clásicamente
M2	Macrófago activados alternativamente
mA	MiliAmpere
mg	Miligramo
min	Minuto
ml	Mililitro
MMP	Metaloproteasa de la Matriz Extracelular
NADP	Nicotinamida adenina dinucleótido
NIH	Instituto De Salud De Los Estados Unidos
nm	Nanometro
NO	Óxido Nítrico
NOS	Óxido Nítrico Sintasa
NS	No Significativo
OMS	Organización Mundial de la Salud
OPS	Organización Panamericana de la Salud
PBS	Buffer Fosfato Salino
PCR	Reacción en Cadena de la Polimerasa
PFA	Paraformaldheído
pg	Picogramo
pi	Post-infección
PMA	<i>Phorbol-12-myristate-13-acetate</i>
PPAR	Receptores Activados por factores de proliferación peroxisomal
PPREs	Elementos de Respuesta Específicos a PPAR
qRT-PCR	Reacción en Cadena de la Polimerasa cuantitativa y en tiempo real
ROR γ t	<i>Related Orphan Receptor gamma</i>
ROS	Especies Reactivas del Oxígeno
RXR	Ácido retinoico
seg	Segundos
SENASA	Servicio Nacional De Sanidad Y Calidad Agroalimentaria
spi	Semanas Post Infección
STAT	<i>Signal Transducer and Activator of Transcription</i>
<i>T. cruzi</i>	<i>Trypanosoma cruzi</i>
Tc	Grupo de ratones infectados con <i>T. cruzi</i>
Tc+F	Grupo de ratones infectados con <i>T. cruzi</i> y tratados con fenofibrato
TGF β	Factor de Crecimiento Transformante beta
Th	Células T helper
Tm	Temperatura de fusión (Temperatura de melting)
TNF α	Factor de Necrosis tumoral alfa
Treg	Células T reguladoras
Tris	Tris-(Hidroximetil)-Aminometano
UDTs	Unidades Discretas de Tipificación
WT	<i>Wild Type</i>
Ym1	<i>Rodent-Specific Chitinase-like protein</i>

Tabla A1: tabla de abreviaturas utilizadas en el texto.