



LABORATORIO DE TOXICOLOGÍA, FACULTAD DE FARMACIA, UNIVERSIDAD DE VALPARAÍSO Y PROGRAMA DE FARMACOLOGÍA CLÍNICA Y MOLECULAR, ICBM FACULTAD DE MEDICINA, UNIVERSIDAD DE CHILE.

EVALUACIÓN DEL EFECTO DE SIMVASTATINA SOBRE LA ACTIVIDAD ANGIOGÉNICA EN UN MODELO CELULAR TRIDIMENSIONAL INFECTADO CON *Trypanosoma cruzi*

Tesis para optar al Título de Químico Farmacéutico

**SEBASTIÁN ALEJANDRO ALFARO LOBOS**

Director de Tesis: Dra. Carolina Campos Estrada

Director de Tesis: Dr. Juan Diego Maya

2018

*A Fernando y Marisol, mis padres,  
y José Ignacio, mi hermano  
por su apoyo incondicional  
en todo sentido.*

*A Belén, por su amor y paciencia.  
Por creer en mí en todo momento.*

Fue un período corto en el gran contexto de la vida, sin embargo, estuvo lleno de aprendizajes, no sólo académicos sino también valóricos y emocionales. Sólo tengo palabras de agradecimiento para todos quienes me han apoyado y guiado en este proceso.

Al Dr. Juan Diego Maya quien me recibió desinteresadamente en su laboratorio y confió en mí. Gracias por todo el apoyo y por valorar el trabajo efectuado desde el punto de vista académico así como desde una perspectiva humana. Gracias por ampliar mi visión de las cosas y por enseñarme a mirar todo desde un gran contexto.

A la Dra. Carolina Campos quien desde el principio creyó en las capacidades que tenía ocultas y confió su imagen en mí, al enviarme a su antiguo hogar de aprendizaje. Su guía e inspiración me enseñaron las cosas que realmente importan, no solamente en la investigación, sino también en la vida. Pese a estar lejos físicamente, siempre sentí su apoyo y cariño hacia mí, esforzándose en cada momento para que yo notase los logros y avances que estaba consiguiendo, sobre todo, cuando yo no era capaz de verlos.

A la Dra. Fernanda Cavieres por facilitar sus instalaciones y apoyar de maneras silenciosas a los avances en el presente trabajo. Gracias por su apoyo y energías plasmadas en su carácter.

A la Dra. Ulrike Kemmerling y a la Dra. Rocío Álvarez por sus enseñanzas y aportes hacia el trabajo realizado. Su perspectiva y compromiso externo fue de gran ayuda para la mejoría de las ideas plasmadas.

A todos y cada uno de los funcionarios de los laboratorios de toxicología en Valparaíso y del ICBM en Santiago, quienes desinteresadamente hacían más de lo correspondiente a sus labores para ayudar y apoyar desde su mirada a la elaboración de este trabajo.

A Fabiola y Daniela quienes me recibieron e instruyeron en el manejo de todo lo necesario para elaborar este trabajo ofreciéndome su ayuda, apoyo académico y amistad. Me aconsejaron y resolvieron dudas y problemas que de otro modo hubiesen sido muy difícil afrontar solo. Gracias por todo.

Del mismo modo, todos y cada uno de los integrantes de los laboratorios en los que participé me ayudaron no solo a resolver dudas o inconvenientes metodológicos, sino que también me apoyaron de manera emocional y anímica. Agradezco enormemente, todos los momentos de risa y diversión, por recibirme cálidamente y ayudarme a cumplir con este proceso. A Benjamín, Bárbara, Cristian, Alejandra, Michel, Helena, Ileana, Sebastián, Renato, Charlotte, Marcelo, Cristian, Diego, Raul, Mabel y a todos quienes pasaron por el laboratorio de alguna u otra forma.

Agradezco a mi familia por estar siempre dispuestos a hacer sacrificios para que yo cumpla mis sueños y objetivos. Aun cuando no entendiesen lo que estaba haciendo, siempre me han apoyado en todo aspecto.

Y finalmente a Belén quien estuvo conmigo de principio a fin, apoyándome y brindando las palabras que muchas veces necesité para adquirir coraje y continuar hasta el fin con lo que me propuse. Gracias por ayudarme a ver en mí lo que soy capaz, a encontrar las soluciones y por escucharme, gracias por estar tan cerca aun en la lejanía, gracias por ser luz en la oscuridad.

## RESUMEN

La enfermedad de Chagas es una infección sistémica, causada por el parásito *Trypanosoma cruzi*. Las principales manifestaciones clínicas se originan en la capacidad del parásito de provocar una respuesta inflamatoria persistente que en un 30% deriva en una cardiopatía crónica. La patogénesis se fundamenta en el daño por parte del parásito, el daño del sistema inmune, alteraciones en la conducción y alteraciones microvasculares. Esto último genera focos isquémicos, provocando necrosis de cardiomiocitos con el consecuente remodelado cardíaco y pérdida de la funcionalidad. El tratamiento contempla la erradicación del parásito mediante fármacos tripanocidas como benznidazol y nifurtimox, no obstante, no revierte las consecuencias crónicas de la infección generando la necesidad de buscar mejores estrategias terapéuticas. Se ha observado que simvastatina, a través de sus efectos *pleiotrópicos*, es capaz de inducir la formación de nuevos vasos sanguíneos mediante un efecto dosis dependiente. Con la previa construcción de un modelo tridimensional de células endoteliales microvasculares cardíacas humanas (HMVEC) y fibroblastos cardíacos humanos (NHFC), infectado con *Trypanosoma cruzi*, se estudió el efecto de simvastatina sobre la migración de células endoteliales y formación de microtubos en matrigel. Para ello, cocultivos esféricos de HMVEC y NHFC, fueron incubados por 24 horas y luego de ser traspasados a pocillos de 200  $\mu$ L con matrigel, fueron tratados con simvastatina 5; 50 y 500 nM. La infección con *T. cruzi* produjo una disminución de migración de células endoteliales y generación de microrredes tubulares en los esferoides, mientras que simvastatina, luego de 72 horas de incubación indujo significativamente sobre esferoides infectados, migración y formación de microtubos endoteliales a 500 nM. Este hallazgo podría generar una modulación de la respuesta del hospedero frente al parásito, disminuyendo la progresión de la enfermedad.

## ABSTRACT

### THE EFFECT OF SIMVASTATIN ON ANGIOGENIC ACTIVITY IN A THREE-DIMENSIONAL CELL MODEL INFECTED BY *Trypanosoma cruzi*

Chagas disease is a systemic infection caused by the *Trypanosoma cruzi* parasite. The main clinical manifestations are originated in the capacity of this parasite to create a persistent inflammatory response in which a 30% of the cases result in a chronic heart disease. Pathogenesis is substantiated in the harm caused by the parasite, the damage of the immune system, variations in the conduction and microvascular alterations. The latter generates ischemic focuses resulting in cardiomyocytes necrosis with the consequent cardiac remodeling and loss of functionality. Treatment considers the eradication of the parasite through trypanocidal drugs as benznidazole and nifurtimox. Nonetheless, it does not reverse chronic consequences of the infection, generating the necessity to look for better therapeutic strategies. It has been observed that simvastatin, through its *pleiotropic* effects, is able to induce the formation of new blood vessels by dose-dependent effect. With the prior construction of a three-dimensional model of Human Microvascular Endothelial Cells (HMVEC) and Normal Human Fibroblast Cells (NHFC), both of cardiac origin, infected by *Trypanosoma cruzi*, the effect of simvastatin on migration of endothelial cells and formation of microtubes in Matrigel was studied. Spheroidal co-cultures of HMVEC and NHFC were incubated for 24 hours. Then, spheroids were transferred into wells (200  $\mu$ L) with Matrigel and they were treated with simvastatin (5, 50 and 500 nM). The infection with *T. cruzi* decreased endothelial cells migration and generation of tubular micro-grids in the spheroids, while incubation with simvastatin (500 nM) for 72 hours induced endothelial migration and formation of microtubes on infected spheroids. This finding could generate a modulation of the response of the host against the parasite, decreasing the progression of the disease.

## ÍNDICE DE CONTENIDOS

## PÁGINA

### **1. INTRODUCCIÓN**

Antecedentes epidemiológicos -----	6
Ciclo biológico y transmisión de <i>T. cruzi</i> -----	7
Manifestaciones clínicas de la enfermedad de Chagas -----	9
Etiopatogenia de la cardiopatía chagásica -----	10
Disfunción endotelial durante la infección -----	11
Infección por <i>T. cruzi</i> y angiogénesis -----	14
Tratamiento farmacológico -----	15
Modelo de cultivo celular tridimensional -----	21
Cocultivos esferoidales -----	23

### **2. HIPOTESIS ----- 27**

### **3. OBJETIVOS**

Objetivo general -----	28
Objetivos específicos -----	28

#### **4. MATERIALES Y MÉTODOS**

Líneas celulares -----	29
Obtención de parásitos -----	29
Cocultivo esférico -----	30
Crecimiento de esferoides -----	30
Reconstrucción del modelo tridimensional por microscopía confocal -----	30
Tratamiento farmacológico de los esferoides -----	30
Formación de microtubos en matrigel -----	31
Análisis estadístico -----	31

#### **5. RESULTADOS**

Caracterización morfológica del modelo esférico -----	32
Efecto de simvastatina sobre la migración endotelial y formación de microtubos en cocultivos esféricos de HMVEC y NHFC infectados con <i>T. cruzi</i> -----	40

#### **6. DISCUSIÓN ----- 42**

#### **7. CONCLUSIÓN ----- 46**

#### **8. BIBLIOGRAFÍA ----- 47**

# 1. INTRODUCCIÓN

## 1.1 Antecedentes epidemiológicos

La enfermedad de Chagas es una infección sistémica causada por el parásito *Trypanosoma cruzi*, descrita por el médico brasileño Carlos Chagas en 1909. Esta patología es endémica en países de Centro y Sudamérica en los que la pobreza, falta de higiene y tipos de vivienda aumenta la posibilidad de infección.

Se estima que existen entre 8 a 10 millones de personas en el mundo infectadas con *T. cruzi*, concentrados principalmente en Latinoamérica (FIGURA 1). Sin embargo, los recientes estudios epidemiológicos indican un cambio en esta distribución debido a los movimientos migratorios que han globalizado la enfermedad (WHO, 2010), incluso se ha observado un gran número de casos en Norteamérica, Europa y Oceanía donde no existe el vector pero si viven inmigrantes de países endémicos (Bern, 2011; Requena-Méndez *et al.*, 2015).

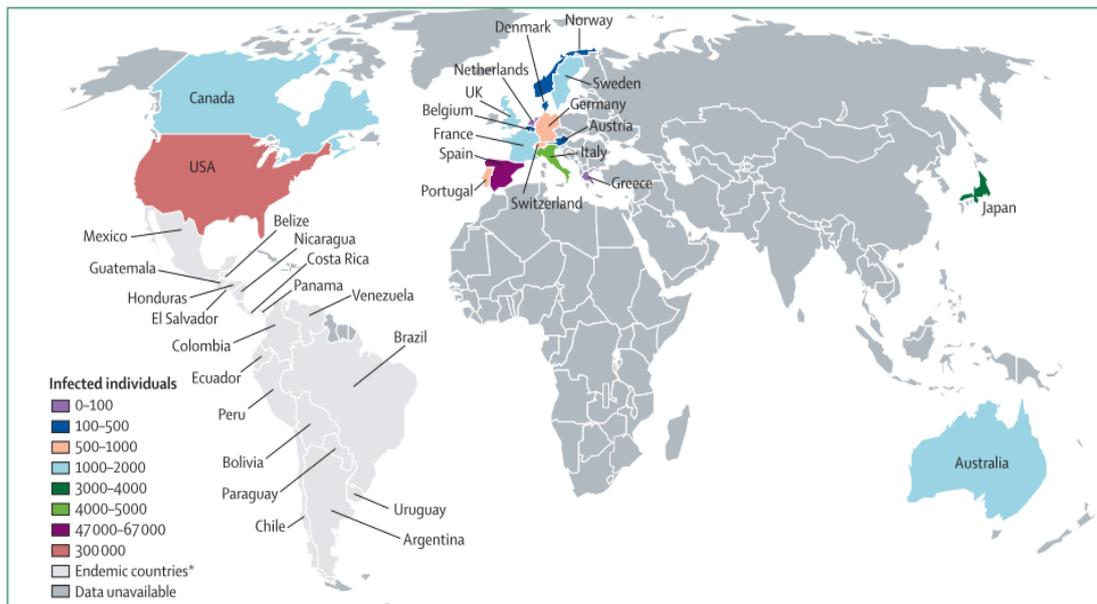


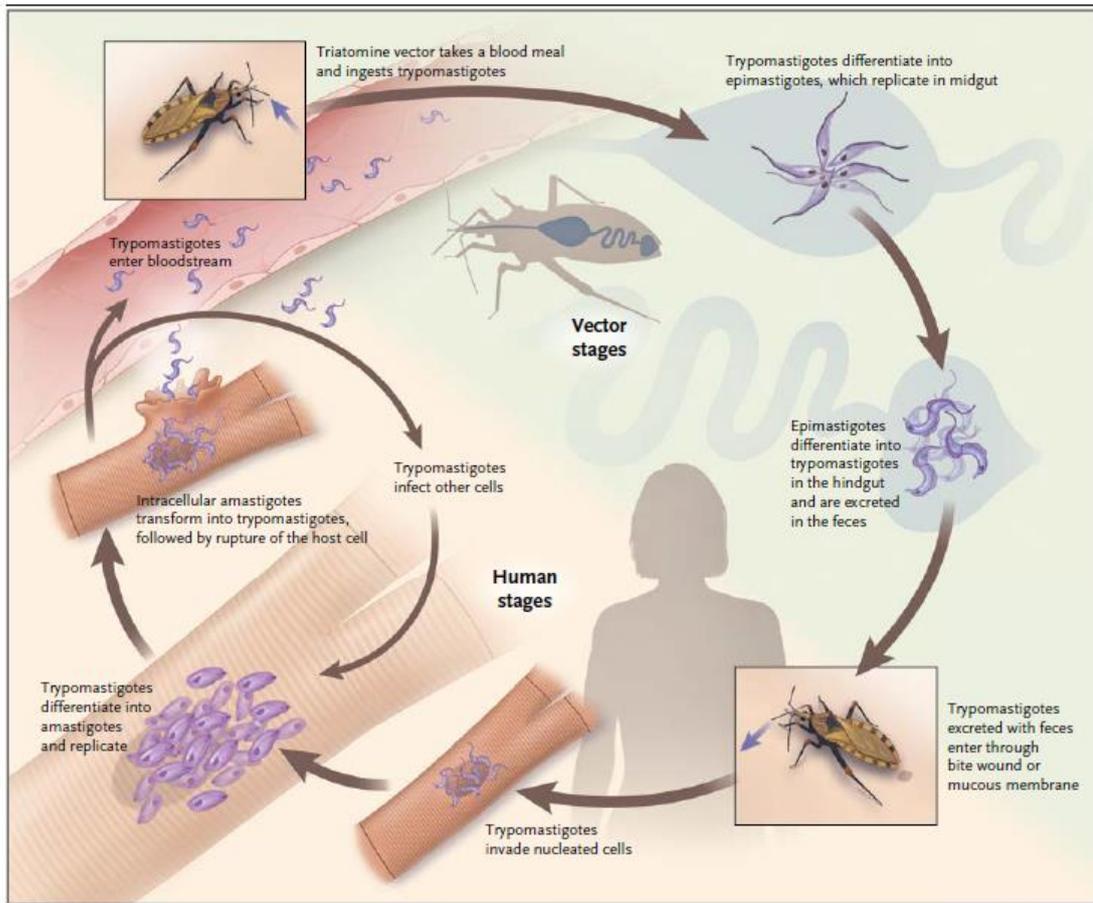
FIGURA 1. Prevalencia estimada de la infección por *T. cruzi* (Rassi. *et al.*, 2010)

Latinoamérica ha tenido un progreso sustancial hacia el control de la enfermedad, ya que la prevalencia global de infecciones por *T. cruzi* declinaron de 18 millones en 1991, año en que comenzó la primera iniciativa de control regional, a 5,7 millones en 2010 (Rassi *et al.*, 2010; Rassi. *et al.*, 2012; World Health Organization, 2015). Sin embargo, la enfermedad de Chagas sigue siendo la enfermedad parasitaria más importante en el hemisferio occidental, causando cerca de 12 mil muertes anuales (Pecoul *et al.*, 2016).

En Chile, la presencia del vector se extiende entre las regiones de Arica-Parinacota, y Libertador Bernardo O`Higgins, en donde aproximadamente 873.415 personas se encuentran en riesgo de contraer la infección, concentradas en áreas rurales y periurbanas (Calavaro. *et al.*, 2014).

## **1.2 Ciclo biológico y transmisión de *T. cruzi***

El ciclo de vida de *T. cruzi* comienza cuando el vector, *Triatoma infestans*, ingiere tripomastigotes circulantes en la sangre de algún huésped mamífero infectado, estos se diferencian en epimastigotes (etapa principal de replicación en invertebrados) en el intestino medio del vector. Luego, los epimastigotes migran al intestino posterior y se diferencian a su forma infectiva llamada tripomastigote metacíclico, el cual es excretado con las fecas del vector. Esta forma parasitaria es capaz de ingresar a través de la mucosa expuesta tras la picadura del insecto vector. Infecta células nucleadas, en cuyo interior los tripomastigotes se diferencian a su forma intracelular replicativa denominada amastigote. Los amastigotes, mediante divisiones binarias sucesivas se replican con un tiempo de duplicación de aproximadamente 12 horas durante un periodo de 4 a 5 días. Finalmente, los amastigotes se transforman a tripomastigotes, la célula huésped se rompe, y los tripomastigotes son liberados a la circulación para invadir nuevas células e iniciar un nuevo ciclo replicativo, además de estar disponibles para infectar otros vectores que se alimenten del hospedero infectado como se muestra en la figura 2 (Bern, 2011).



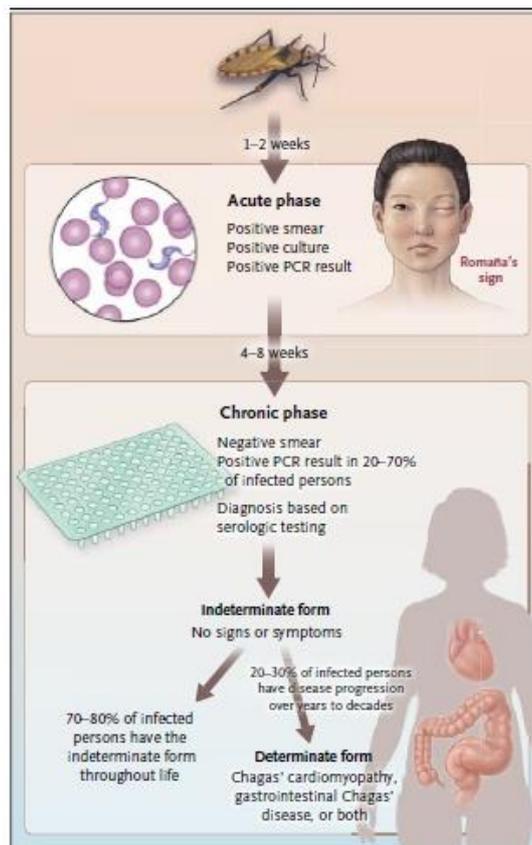
**FIGURA 2.** Ciclo de vida de *Trypanosoma cruzi* (Bern, 2015)

La principal vía de transmisión es vectorial en las zonas endémicas, en las que el insecto hematófago se encuentra presente. Sin embargo, la infección puede ser transmitida por otras vías como transfusiones sanguíneas, donación de órganos y congénitamente de una madre a un hijo (Bern, 2011). Otras vías menos frecuentes de transmisión son por accidentes de laboratorio o brotes por transmisión oral, a través de alimentos o bebidas contaminadas (Carvalho, 2012; Herwaldt, 2001 & Shikanai-yasuda) Recientemente, se ha encontrado evidencia que también podría ser transmitida mediante contacto sexual (Araujo *et al.*, 2017).

### 1.3 Manifestaciones clínicas de la enfermedad de Chagas

Las principales manifestaciones clínicas son de origen digestivo y cardíaco, pueden presentarse como una fase inicial o aguda con síntomas leves e inespecíficos como fiebre, malestar general, esplenomegalia y linfocitosis atípica, así como también la muerte. En casos raros, se puede presentar un nódulo cutáneo (chagoma) o un edema de párpado prolongado indoloro (signo de romaña) que puede indicar el lugar de la inoculación. En las personas que sobreviven a la fase aguda, la respuesta inmune mediada por células controla la replicación del parásito, los síntomas se resuelven espontáneamente y la parasitemia desaparece en 4 a 8 semanas (Rassi *et al.*, 2012).

En la fase crónica, cuyo diagnóstico se basa principalmente en la detección serológica de anticuerpos contra el parásito, la supervivencia del hospedero radica en la capacidad por parte de la inmunidad mediada por las células T de mantener la replicación del parásito detenida (Machado *et al.*, 2012). Esta fase se subdivide en una fase determinada y una indeterminada como se muestra en la figura 3. La fase crónica también es asintomática, pero en 30% de los casos, se desarrolla daño orgánico manifiesto, especialmente alteraciones cardíacas o gastrointestinales, como megaesófago o megacolon.



**FIGURA 3.** Fases de la infección por *Trypanosoma cruzi* (Bern, 2015)

La fase asintomática se caracteriza por presentar escasez de parásitos en la circulación sanguínea y serología positiva sin signos y síntomas clínicos de la enfermedad (Prata, 2001). La causa de la ausencia de manifestaciones clínicas probablemente se debe a una inactivación en la diferenciación del parásito intracelular. Es natural pensar que estos pacientes tienen un pronóstico excelente y que su expectativa de vida es similar a la de un individuo sin enfermedad de Chagas. Sin embargo, el problema radica en la posibilidad de reactivación del ciclo parasitario y que el paciente presente manifestaciones graves o incluso mortales si se encuentra inmunodeprimido.

Se estima que entre un 70 a 80% de estos pacientes permanecen en estado asintomático (Dias, 1989; Mitelman, 2011), y que un 20 a 30% desarrolla las manifestaciones clínicas, mostrando alteraciones en el electrocardiograma, enema baritado o evidencia de desarrollo de la cardiopatía definida. La cardiopatía chagásica crónica es la manifestación más importante en aspectos clínicos, debido a su frecuencia y severidad para el paciente (Rassi *et al.*, 2007; Coura & Borges-Pereira, 2010; Rassi *et al.*, 2010; Nunes *et al.*, 2011;). Es la forma más seria de la fase crónica, presentándose en un 90% de los pacientes sintomáticos (Rassi *et al.*, 2006, 2007; Nunes *et al.*, 2011;). Las manifestaciones tempranas de la cardiopatía son usualmente anomalías en la conducción aurículo-ventricular, disfunción diastólica, disfunción sistólica y la incapacidad del llenado ventricular izquierdo (Nunes *et al.*, 2009; Rocha *et al.*, 2009) afectándolo principalmente, mientras que la alteración en el ventrículo derecho suele ser evidente sólo en asociación con la disfunción del ventrículo izquierdo (Pereira Nunes *et al.*, 2004).

#### **1.4 Etiopatogenia de la cardiopatía chagásica**

La etiopatogenia de la enfermedad de Chagas depende de factores propios del parásito y del hospedero, ya que la ausencia de la enfermedad está asociada con la habilidad del sistema inmunológico del hospedero para controlar la infección. Sin embargo, esta respuesta que controla la replicación del parásito, también contribuye al daño ocasionado, mediante la inflamación generada en el proceso.

A través del reconocimiento de antígenos parasitarios por parte de los receptores tipo Toll (TLR), los macrófagos dan inicio a la inmunidad innata, liberando citoquinas pro inflamatorias como interleucina 12 (IL-12) que promueve el reclutamiento de las células *Natural Killer* (NK) con la consecuente liberación de interferón gamma (INF- $\gamma$ ). Esto induce un aumento en la síntesis de IL-12, factor de necrosis tumoral alfa (TNF- $\alpha$ ) y óxido nítrico (NO) en el macrófago, contribuyendo de esa forma a la erradicación del parásito (Sathler-Avelar *et al.*, 2009).

Posteriormente, se activa la inmunidad adaptativa mediada por células T citotóxicas (CD8+) que generan un proceso inflamatorio de baja intensidad, pero, que es intensificado por la acción vasoactiva de péptidos endógenos tales como la bradiquinina (Andrade *et al.*, 2012). En respuesta, las manifestaciones agudas (parasitemia sanguínea e inflamación sistémica) disminuyen gradualmente, pasando así a la fase asintomática de la enfermedad.

No obstante, el parásito encuentra la manera de evadir el sistema inmune, induciendo mecanismos inmunosupresores a través de la activación del factor de crecimiento beta (TGF- $\beta$ ) presente en la matriz extracelular y producción de prostaglandinas antiinflamatorias lo que inhibe la secreción y actividad de interferón gamma (INF- $\gamma$ ) y la expresión de iNOS disminuyendo así la actividad macrófaga para favorecer un ambiente de replicación intracelular. Por otro lado, este proceso provoca apoptosis en linfocitos T inducida por TNF- $\alpha$  proveniente de los macrófagos activados que fagocitan los restos celulares ingresando con ellos tripomastigotes que sin ser detectados no activan a estas células fagocíticas. El macrófago no activado deriva la utilización intracelular de arginina desde la producción de óxido nítrico hacia poliaminas que son sustratos para la síntesis de tripanotión por parte del parásito, un antioxidante que favorecerá la proliferación del parásito garantizando su permanencia en el tejido cardíaco (Freire-De-Lima *et al.*, 2000).

La persistencia del parásito en el tejido cardíaco otorga la principal característica de la cardiopatía chagásica crónica, la inflamación, desencadenando cambios estructurales irreversibles asociados al reemplazo de tejido cardíaco por tejido fibroso con acumulación extracelular de colágeno, engrosamiento de la membrana basal y, por tanto, remodelado cardiovascular. El remodelado cardiovascular repercute en la pérdida de la funcionalidad observando anomalías en la perfusión miocárdica, disfunción ventricular con insuficiencia cardíaca, bloqueos cardíacos, e incluso falla ventricular que provoca la muerte (Carod-Artal & Gascon, 2010; Coura & Borges-Pereira, 2010; Ribeiro *et al.*, 2012).

### **1.5 Disfunción endotelial durante la infección**

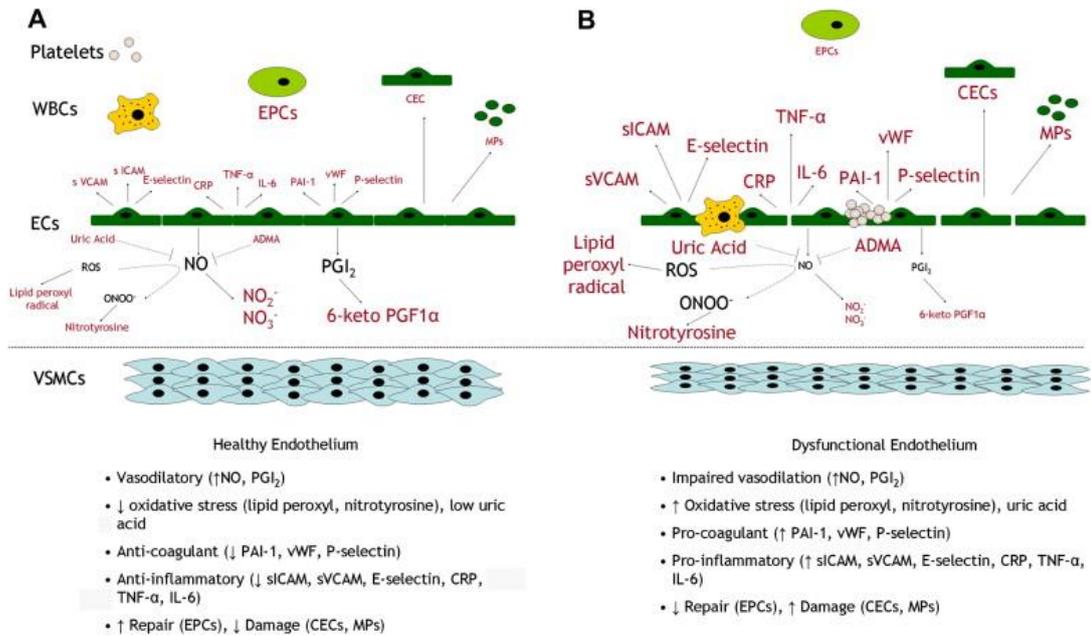
Bajo condiciones normales el endotelio muestra un fenotipo vasodilatador que consiste en niveles elevados de vasodilatadores como óxido nítrico (NO) y prostaciclina (PGI<sub>2</sub>) y bajos niveles de especies reactivas de oxígeno (ROS) y ácido úrico. También tiene un fenotipo anticoagulante, es decir, niveles bajos de inhibidor del activador del plasminógeno 1 (PAI-1), factor de von Willebrand (vWF) y selectina P. Puede haber muy poca inflamación, al tener bajos niveles de moléculas de adhesión vascular (VCAM), molécula de adhesión intercelular (ICAM), E-selectina, proteína C-reactiva (CRP), factor de necrosis tumoral alfa (TNF-  $\alpha$ ) e interleucina-6 (IL-6). Finalmente, la población de células progenitoras endoteliales (CPE, indicativas de la capacidad de reparación vascular) es alta; mientras que los niveles de micropartículas endoteliales (PEM) y células endoteliales circulantes (CEC), indicativos de estrés y/o daño endotelial, son bajos.

Durante la infección por *T. cruzi*, el endotelio se activa y se vuelve disfuncional. En este caso las características fenotípicas se invierten incluyendo vasoconstricción, aumento del estrés oxidativo / ácido úrico, radical de peróxido lipídico y nitrotirosina, se observa un fenotipo procoagulante y proinflamatorio con menor capacidad de reparación vascular (Figura 4).

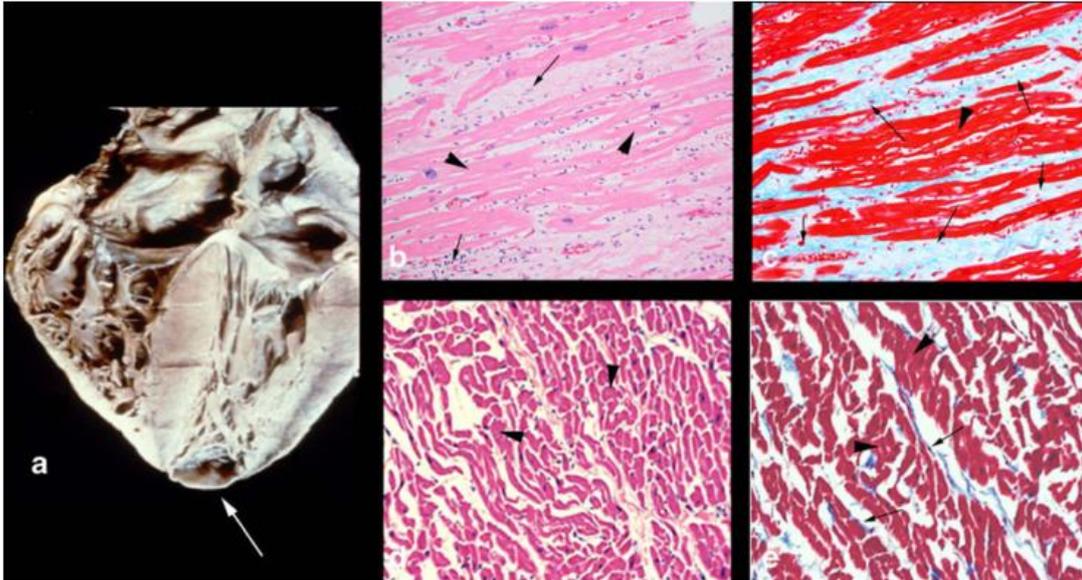
Para acceder al tejido cardíaco, los tripomastigotes necesitan atravesar la vasculatura por lo tanto, la interacción entre el parásito y el endotelio es importante en la patogenia de la infección y por ende, un blanco terapéutico de gran interés (Rossi *et al.*, 2010).

Está demostrado que *T. cruzi* induce la activación endotelial, dando inicio al proceso de inflamación que involucra cambios en el tono vascular y la permeabilidad a través de la liberación de endotelina-1 (Andrade *et al.*, 2012), aumento de la expresión de citoquinas pro inflamatorias y de moléculas de adhesión celular (CAMs, por su sigla en inglés) con la consecuente adhesión leucocitaria (Molina-Berríos *et al.*, 2013) por mecanismos que involucran la activación del factor nuclear  $\kappa$ B (NF  $\kappa$ B) (Huang *et al.*, 2003) y agregación plaquetaria mediante la liberación de tromboxano A<sub>2</sub> y factor de Von Willebrand (Videm & Albrigtsen, 2008). Esto promueve la generación de un cuadro isquémico local y consecuentemente mionecrosis focal, dando inicio a la degradación de la matriz extracelular que conduce a un adelgazamiento de las paredes ventriculares y aneurismas apicales. Estos cambios estructurales iniciados en la activación endotelial y continuados por la inflamación miocárdica propiamente dicha, generan fibrosis lo que conduce al remodelamiento cardíaco, dilatación ventricular, hipertrofia y cambios irreversibles que alteran el normal funcionamiento del corazón tal como se ve en el examen histológico de la figura 5 (Machado *et al.*, 2012).

Por lo tanto, la patogénesis de esta enfermedad se fundamenta en el daño ocasionado por parte del parásito y del sistema inmune, alteraciones en la conducción y alteraciones microvasculares. Esto amplía las posibilidades de abordar las consecuencias crónicas de la enfermedad desde diferentes perspectivas.



**FIGURA 4. Fenotipo de endotelio sano y disfuncional.** Endotelio sano (A), endotelio disfuncional (B). Óxido nítrico (NO), prostaciclina (PGI<sub>2</sub>), especies reactivas de oxígeno (ROS), inhibidor del activador del plasminógeno 1 (PAI-1), factor de von Willebrand (vWF), moléculas de adhesión vascular (VCAM), molécula de adhesión intercelular (ICAM), proteína C-reactiva (CRP), factor de necrosis tumoral alfa (TNF- α) e interleucina-6 (IL-6), población de células progenitoras endoteliales (CPE), micropartículas endoteliales (PEM), células endoteliales circulantes (CEC). La explicación de los procesos que figuran en la imagen se encuentra en el texto. (Rajendran et al., 2013)



**FIGURA 5.** Corazón de un paciente con cardiopatía chagásica crónica: **(A)** se evidencia un agrandamiento de las cuatro cámaras del corazón en un paciente chagásico. La flecha indica el aneurisma apical **(B)** tinción de hematoxilina-eosina de corazón de un paciente con cardiopatía chagásica crónica que muestra, indicado por la flecha, fibrosis e inflamación crónica **(C)** corresponde al mismo corazón con la tinción de tricromo de Masson que muestra en azul (indicado por las flechas) fibrosis significativa **(D)** tinción de hematoxilina-eosina y tricromo de Masson juntas **(E)** corresponde a la tinción de miocardio donado de un paciente sano (las puntas de las flechas marcan el miocardio) (Machado *et al.*, 2012)

### 1.6 Infección por *T. cruzi* y angiogénesis

La angiogénesis es generación de nuevos vasos sanguíneos a partir de una red de vasos preexistente que bajo la estimulación adecuada de factores proangiogénicos, tales como el factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF por sus siglas en inglés) y el factor de crecimiento de fibroblastos básico (bFGF), las células endoteliales comienzan a formar nuevos vasos capilares en los siguientes pasos: a) disolución de la membrana basal por proteasas b) proliferación y migración de células endoteliales c) formación de tubos capilares y d) supervivencia de los vasos sanguíneos recién formados.

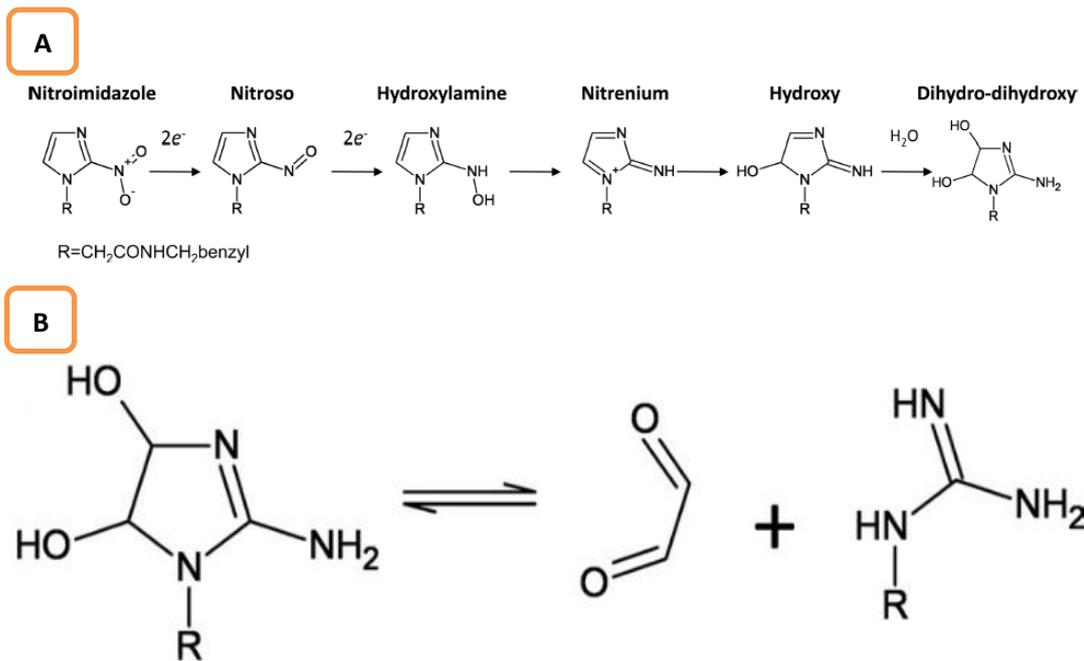
Este proceso está involucrado en el crecimiento y desarrollo fisiológico normal. Así como también, forma un sello distintivo en numerosas enfermedades cuando está desregulado. Un exceso de angiogénesis es característico de muchas formas de cáncer, psoriasis, ceguera y artritis mientras que el crecimiento insuficiente de vasos y la regresión anormal de éstos puede provocar isquemia cardíaca y cerebral, neurodegeneración, hipertensión, osteoporosis y preclampsia (Carmeliet, 2003).

En el caso de la enfermedad de Chagas, las alteraciones microvasculares generadas por el parásito generan cuadros isquémicos provocando necrosis focal de cardiomiocitos con el consecuente remodelado cardíaco y pérdida de la funcionalidad. Esto es debido a la formación de microagregados plaquetarios y microtrombos focales producto de la generación de tromboxano A2 por el parásito (Ashton *et al.*, 2007) y la activación endotelial provocada por la infección de este tejido (Molina-Berríos *et al.*, 2013). Sin perjuicio de los eventos expuestos, también hay reportes en los cuales se indica que el parásito genera moléculas antiangiogénicas, que podrían influir en la fisiopatología de la cardiomiopatía chagásica (Ferreira *et al.*, 2005). En conclusión, durante la infección por *T. cruzi*, la generación eventos intravasculares por compromiso endotelial inducidos por el parásito puede ser central en la fisiopatología de la cardiopatía chagásica.

### 1.7 Tratamiento farmacológico

El tratamiento de la enfermedad de Chagas tiene como objetivo erradicar el parásito con fármacos tripanocidas a lo cual debería agregarse esfuerzos por tratar las complicaciones de la cardiopatía chagásica. La terapia antiparasitaria está indicada en niños, pacientes con infección aguda, recientes y pacientes con reactivación por inmunosupresión. En los casos de riesgo de transmisión congénita no se realiza tratamiento durante el embarazo, sino que al término de la lactancia se trata a la madre y si el recién nacido es confirmado con serología y PCR positivo se inicia tratamiento del niño (Calavaro *et al.*, 2014).

La eficacia del tratamiento en fase aguda ha sido demostrada, pero en la fase crónica no se logra la curación total, dejando en duda su eficacia (Hall & Wilkinson, 2012). Los fármacos tripanocidas utilizados son benznidazol y nifurtimox. Ambos fármacos son prodrogas que necesitan ser reducidos por una nitrorreductasa tipo I dependiente de NADPH (NTI) para ejercer su mecanismo de acción. Nifurtimox es un nitrofurano, cuyo mecanismo de acción aún no está completamente descrito, existiendo evidencia que su efecto estaría mediado por la inducción de estrés oxidativo (Hall B.S *et al.*, 2011), inhibición de la síntesis de ácido pirúvico y alteración del metabolismo de los carbohidratos de *T. cruzi*, lo que provocaría citotoxicidad en el parásito. Por otro lado, benznidazol es un derivado nitroimidazol, que por acción de la NTI insensible de oxígeno es reducido a un derivado nitroso recibiendo 2 electrones desde el cofactor flavínico FMNH dependiente de NADH. Luego, ocurre una segunda reducción de 2 electrones para formar un derivado hidroxilamina que en condiciones neutras se reorganiza a un hidroxil derivado y en presencia de agua puede generar la forma *cis* o *trans* del producto dihidro-dihidroxi como se muestra en la figura 6 A, compuesto que causa citotoxicidad en el parásito.



**FIGURA 6.** Ruta metabólica de benznidazol (Hall & Wilkinson, 2012)

En presencia de oxígeno, actúa una nitrorreductasa tipo II (NTII), capaz de donar 1 electrón para reducir al benznidazol en un metabolito intermediario reactivo, razón por la cual se pensó que su mecanismo antiparasitario estaba asociado al estrés oxidativo. Sin embargo, actualmente se ha descartado que benznidazol genere estrés oxidativo tras la biotransformación por NTII, ya que datos experimentales han demostrado que la adición de benznidazol a extractos de *T. cruzi* no provoca niveles significativos de especies reactivas de oxígeno. Actualmente, se cree que la biotransformación de benznidazol vía NTI genera el metabolito 4,5-dihidro-4,5-dihidroxiimidazol que puede romperse para liberar un dialdehídoglioxal (FIGURA 6 B) altamente reactivo capaz de formar aductos con proteínas, pequeñas moléculas como el glutatión y específicamente con guanosinas del ADN alterando así la viabilidad del parásito (Whitmore & Varghese, 1986; Thornalley, 2008).

Clínicamente, se considera a benznidazol como tratamiento de primera línea debido a la evidencia que existe de mayor eficacia *in vitro*, *in vivo*, y en pacientes con cardiopatía crónica, y un mejor perfil de efectos secundarios que nifurtimox (Bern *et al.*, 2007). Sin embargo, los resultados de BENEFIT, un ensayo diseñado para evaluar la eficacia y seguridad de benznidazol en pacientes con cardiopatía chagásica, arrojaron que pese a que benznidazol es eficaz en el tratamiento de pacientes con enfermedad de Chagas durante su fase aguda temprana, no muestra resultados estadísticamente significativos en la mejoría de pacientes con la cardiopatía establecida; es más, no se evidenció diferencia en la disminución de la mortalidad de pacientes tratados con benznidazol en comparación a los tratados con placebo, falleciendo entre 17%-18% por complicaciones cardíacas en ambos casos. Esto es un reflejo de que, pese a que pacientes pueden presentar disminución en los títulos de anticuerpos, no garantiza la erradicación del parásito

y, por otro lado, los daños cardíacos se mantienen. Por lo tanto, aún no se sabe si hay beneficios clínicos en la progresión hacia la cardiopatía chagásica con la cura parasitológica durante la fase indeterminada de la enfermedad (Pecoul *et al.*, 2016).

Por otro lado, ambos fármacos producen importantes efectos adversos, especialmente en adultos, porque recién nacidos y niños pequeños presentan mejor tolerancia a estos fármacos. Dentro de las reacciones adversas que se presentan en los pacientes mencionados se encuentran las de tipo gastrointestinales como anorexia, pérdida de peso, náuseas y vómitos (Jackson *et al.*, 2010), alteraciones hematológicas como leucopenia, trombocitopenia y agranulocitosis, efectos neurotóxicos que incluyen irritabilidad, insomnio, desorientación y temblores, y reacciones dermatológicas como erupciones cutáneas (Apt W., 2010).

Debido a estas reacciones adversas, existe un alto incumplimiento y baja adherencia al tratamiento, que junto a la falta de eficacia clínica en fase crónica demuestra la necesidad que existe de buscar nuevas estrategias farmacológicas que incrementen la actividad tripanocida de estos fármacos, contribuyan al manejo de las complicaciones, y que al mismo tiempo disminuyan la aparición de efectos laterales.

La terapia de combinación de fármacos puede ser una forma valiosa de mejorar la eficacia del tratamiento debido a su capacidad para reducir las dosis, la toxicidad y para prevenir el posible desarrollo de resistencia a los medicamentos antiinfecciosos.

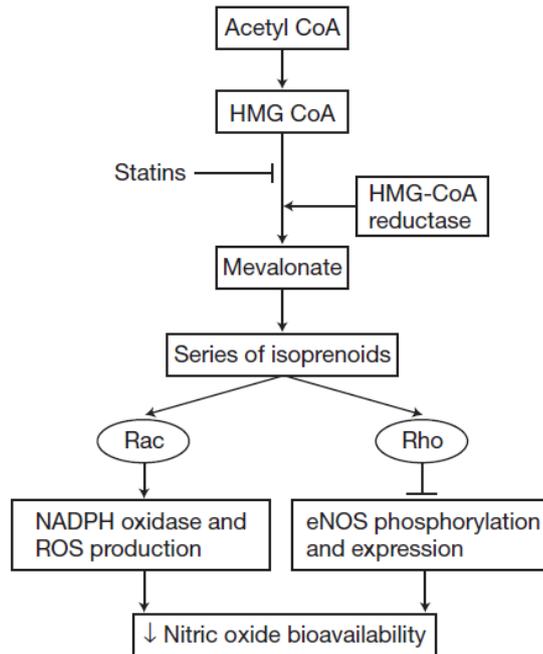
Los inhibidores de la biosíntesis de ergosterol (EBI), como posaconazol, son agentes anti *T. cruzi*. Su mecanismo de acción (inhibición del esteroles C14 $\alpha$  desmetilasa) se basa en el requisito esencial del parásito de utilizar esteroides endógenos para su supervivencia y proliferación, así como el suministro abundante de colesterol disponible en los huéspedes mamíferos (Urbina J., 2009). Estos presentan significativa actividad *in vitro* e *in vivo* con ausencia de resistencia cruzada con los fármacos actualmente disponibles, pero la respuesta al tratamiento farmacológico varía fuertemente entre diferentes cepas parasitarias (Molina *et al.*, 2000; Toledo *et al.*, 2003; Urbina J. *et al.*, 2003; Guedes *et al.*, 2004). Los derivados azólicos usados en combinación con EBI que actúan en otras etapas de la ruta de biosíntesis de esteroides ha demostrado tener un efecto tripanocida sinérgico tanto *in vitro* como *in vivo* (Urbina J. *et al.*, 1988) lo que propició la investigación de la asociación de posaconazol y benznidazol. Los resultados demostraron que las combinaciones de benznidazol y posaconazol, a dosis subóptimas o usándolos en tratamientos más cortos, tuvieron una eficacia equivalente o superior que los fármacos administrados en sus dosis óptimas a la duración total del tratamiento en un modelo murino de enfermedad de Chagas (Diniz *et al.*, 2013). Mediante esta asociación se puede avanzar en términos de mejorar la actividad tripanocida y disminución de reacciones adversas en la erradicación de la infección.

Últimamente, han surgido estrategias terapéuticas interesantes orientadas a mejorar las alteraciones fisiopatológicas de la enfermedad y mejorar la calidad de vida del paciente. Debido a que los mecanismos fisiopatológicos involucrados en estas alteraciones incluyen una vasculopatía inflamatoria gatillada por la presencia de *T. cruzi*, generando una activación endotelial, aumento de la expresión de moléculas de adhesión celular en el endotelio tales como E-selectinas, VCAM-1 e ICAM-1 vía NF- $\kappa$ B, fármacos como las estatinas, utilizados para controlar los niveles de colesterol mediante la inhibición de la enzima 3-hidroxi 3-metilglutaril coenzima A (HMG-CoA) reductasa han demostrado complementar el efecto de benznidazol a través de sus efectos *pleiotrópicos* que incluyen efectos antiinflamatorios y la mejora de la función endotelial. Simvastatina, mediante la inducción de un nuevo eicosanoide pro-resolutorio de la inflamación 15-epi-lipoxina A4 (15-epi-LXA4), metabolito generado por la 5-lipooxigenasa disminuye la vasculopatía inflamatoria inducida por la activación de NF- $\kappa$ B durante la infección por *T. cruzi* (Campos-Estrada *et al.*, 2015).

Además, el aumento de 15-epi-LXA4 inducido por simvastatina probablemente, disminuiría la migración de leucocitos al miocardio, al disminuir la activación endotelial, contribuyendo así a reducir el daño cardíaco. La inducción de la producción de este nuevo eicosanoide es dependiente de la presencia de un factor activador de células endoteliales como el parásito (Campos-Estrada *et al.*, 2015).

Por otro lado, simvastatina podría presentar una acción tripanocida ya que, al inhibir la HMGCoA reductasa evitaría la síntesis de mevalonato y ergosterol en el parásito, metabolitos lipídicos que son claves en la viabilidad de *T. cruzi*, especialmente en las formas replicativas. Por lo que simvastatina podría jugar un rol importante en el control de la replicación del parásito y en las alteraciones miocárdicas de la enfermedad de Chagas (Campos-Estrada *et al.*, 2015).

Los efectos *pleiotrópicos* de las estatinas derivan de su mecanismo de acción que además de inhibir la síntesis de colesterol, inhibe también la síntesis mevalonato, un precursor de compuestos intermedios isoprenoides como farnesil pirofosfato (FPP) y geranilgeranil pirofosfato (GGP) que actúan como enlaces lipídicos para permitir el anclaje de diferentes proteínas G pequeñas (Rho, Rac, cdc42 y Ras) a la membrana celular y, por lo tanto, su activación. La inhibición de la actividad de Rho, es en gran parte responsable de la regulación al alza de la expresión de la óxido nítrico sintasa endotelial (eNOS) (Endres, 2005) lo que aumenta la producción de óxido nítrico (FIGURA 7) (Hazem F. *et al.* 2010) repercutiendo en la mejora de la actividad angiogénica al mediar la proliferación de células endoteliales y por ende la formación de vasos colaterales a través del factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF)(Dimmeler S. *et al.*, 2000). Sin embargo, las estatinas, en dosis bajas pueden también activar directamente la producción de óxido nítrico mediante mecanismos postraduccionales adicionales que implican la activación de la ruta fosfatidilinositol 3-quinasa (PI3K) – proteína kinasa Akt (Elewa *et al.*, 2009).

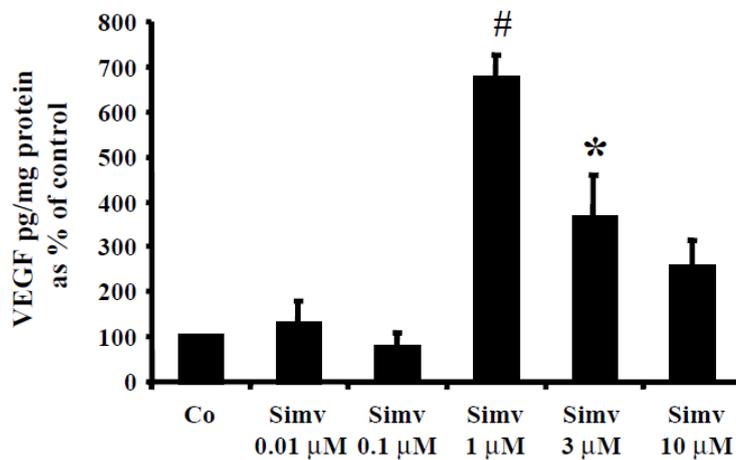


**FIGURA 7.** Inhibición, por parte de las estatinas, de isoprenoides responsables de la activación de Rho y Rac. Rho inhibe la enzima óxido nítrico sintasa endotelial (eNOS) que participa en la síntesis de óxido nítrico, mientras que Rac estimula la enzima nicotinamida adenina dinucleótido de forma reducida de fosfato (NADPH) oxidasa, que produce especies reactivas de oxígeno (ROS). En presencia de estatinas, el resultado neto es la activación de eNOS con la consecuente producción de óxido nítrico y la inhibición de la enzima NADPH oxidasa y el estrés oxidativo (Hazem F. *et al.* 2010)

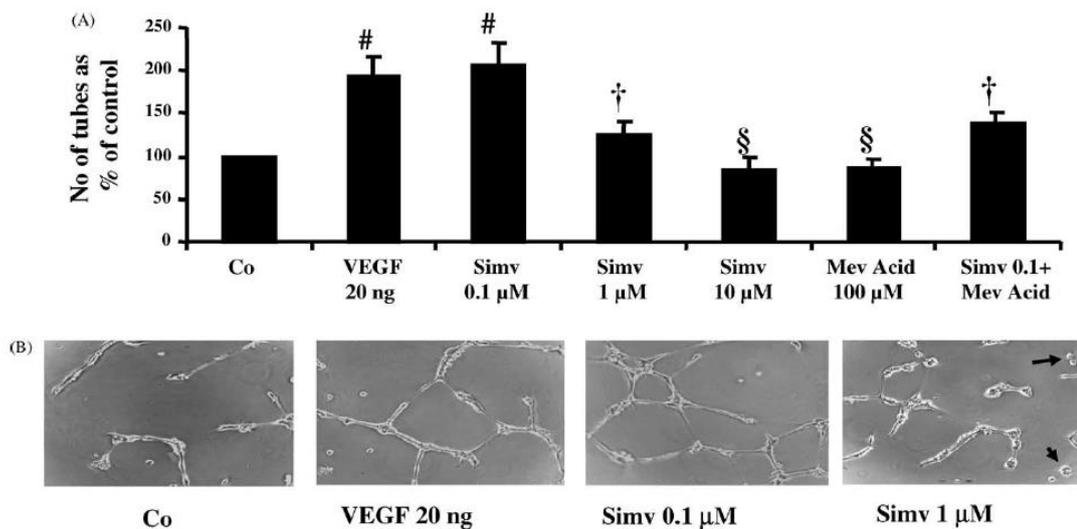
Mientras algunos estudios muestran efectos proangiogénicos de las estatinas (Zhang L. *et al.*, 2007), otros le atribuyen efectos antiangiogénicos (Koyuturk M. *et al.*, 2004). Sin embargo, un tercer grupo de experimentos probó el efecto de las estatinas sobre la angiogénesis a diferentes concentraciones y descubrió que las estatinas tienen un efecto dosis dependiente caracterizada por un efecto proangiogénico a dosis bajas y un efecto antiangiogénico y proapoptótico a dosis altas (Katsumoto *et al.*, 2005). A bajas concentraciones (rango nM) que se parecen a las concentraciones plasmáticas en pacientes que están en tratamiento con estatinas a largo plazo, las estatinas inducen angiogénesis principalmente a través de la vía PI3K-Akt, lo que conduce a la producción de óxido nítrico que estimula la proliferación, migración y diferenciación de células endoteliales (Hu *et al.*, 2008). Sin embargo, a altas concentraciones ( $\mu\text{M}$  o superior), las estatinas son anti angiogénicas mediante mecanismos apoptóticos (Hindler K. *et al.*, 2006).

Un estudio reveló que 10 nM de simvastatina es capaz de aumentar la migración de células endoteliales vasculares umbilicales humanas (HUVEC) mientras que 10  $\mu$ M la disminuye drásticamente. El mismo estudio evidenció que concentraciones de 0,01 nM a 100 nM de atorvastatina estimularon la formación de tubos, en contraste con 1  $\mu$ M de atorvastatina que reduce marcadamente esta formación (Urbich C. *et al.*, 2002).

Otro estudio mostró que simvastatina a concentraciones de 1 a 3  $\mu$ M mejoró la síntesis de VEGF mientras que concentraciones tan bajas como 10 a 100 nM no influyeron significativamente la producción en HUVEC (FIGURA 8). No obstante, el efecto observado de simvastatina sobre la síntesis de VEGF en HUVEC no se condice con su efecto sobre la actividad angiogénica de células endoteliales, ya que la formación de tubos se vio potenciada a un nivel similar a la inducción por VEGF (1-10  $\mu$ M) a concentraciones bajas (100 nM) como se muestra en la figura 9 A y B (Frick *et al.*, 2003).



**FIGURA 8.** Efecto dual de simvastatina sobre la síntesis de VEGF en HUVEC, determinado en HUVEC lisadas. \* $p < 0.05$  vs control; # $p < 0.01$  vs control. (Frick *et al.*, 2003)



**FIGURA 9.** Efecto de simvastatina sobre la diferenciación de células endoteliales. **(A)** Simvastatina a 100 nM favorece la formación de tubos en HUVEC. **(B)** 4 ejemplos de formación de tubos de cultivos de HUVEC sobre matriz de matrigel. Las flechas indican células picnóticas observadas en cultivos tratados con elevadas concentraciones de simvastatina. # $p < 0.001$  vs control; § $p < 0.001$  vs VEGF; † $p < 0.05$  vs VEGF. (Frick *et al.*, 2003)

En resumen, las estatinas promoverían los procesos angiogénicos que han sido bloqueados por la infección por *T. cruzi* y de esta manera podrían revertir, al menos en parte, los efectos activadores endoteliales típicos de la enfermedad crónica lo que contribuiría a la acción antiparasitaria del benznidazol.

### 1.8 Modelo de cultivo celular tridimensional

La primera demostración de crecimiento de células fuera del cuerpo se atribuye a R.G. Harrison quien alrededor de 1907 cultivó pedazos de tejido embrionario de rana en una gota colgante de líquido linfático y estudió el crecimiento de células nerviosas (Harrison, 1999) y curiosamente mostró similitudes con los modelos 3D actuales. La mayoría de las investigaciones sobre tejido vivo se realizaron con huevos y embriones de anfibios en desarrollo, o con cultivos de órganos generados a partir de fragmentos de tejidos disociados mecánicamente. Para el entorno de cultivo, los experimentadores inicialmente dependieron de fluido linfático o plasma para formar un coágulo de fibrina de la misma fuente que el tejido cultivado (Zuppinger, 2016). Con el tiempo, se han introducido técnicas de cultivo celular, como la disociación de tejidos por enzimas y medios sintéticos suplementados con antibióticos.

Tradicionalmente, los estudios celulares se han efectuado en cultivo 2D en monocapa, sin embargo, existen fundamentales diferencias en el microambiente de este sistema de cultivo en comparación a uno en tres dimensiones. Estas diferencias influyen en diversos comportamientos celulares como la unión celular,

su expansión y crecimiento, su morfología y polaridad, expresión de genes y proteínas, viabilidad, proliferación, diferenciación, metabolismo celular y respuesta a estímulos. El factor condicionante de la adaptación de las células en 2D o 3D es la adherencia mediada por integrinas de la matriz extracelular, en el caso de un cultivo en monocapa, la adherencia ocurre en un lado de la célula, mientras que en cultivos tridimensionales, la unión ocurre alrededor de toda la superficie celular (Baker & Chen, 2012). En general, la unión y propagación de células en sustratos bidimensionales ocurre en períodos cortos. Por el contrario, la unión celular en cultivos 3D está precedida por la degradación proteolítica de su entorno físico, que puede ocurrir en horas y en algunos casos en el transcurso de varios días (Khetan S. *et al.*, 2013).

La morfología de una célula puede afectar su funcionalidad. En el caso de los fibroblastos, su morfología, incluyendo la organización de su citoesqueleto y los tipos de adherencias celulares son mayormente similares a su comportamiento *in vivo* cuando crecen en una matriz tridimensional en comparación a un cultivo 2D. Además, se ha encontrado que un entorno 3D es óptimo para soportar las características de señalización intracelular de los fibroblastos (Yamada & Cukierman, 2007; Cukierman E. *et al.*, 2012). Por otro lado, cuando las células endoteliales se mantienen en cultivo celular bidimensional tienden a perder progresivamente su fenotipo diferenciado, por ejemplo, la pérdida de la expresión de CD34 (Fina *et al.*, 1990; Baumhueter S. *et al.*, 1994). Además, a medida que se seleccionan las condiciones de cultivo celular para que las células endoteliales puedan crecer, generalmente no son compatibles con el fenotipo inactivo en reposo que estas células mantienen *in vivo* (Radicals, 2018).

Uno de los aspectos más críticos de los modelos 3D *in vitro* es la necesidad de imitar aspectos específicos de comportamiento celular *in vivo* para permitir la predicción precisa del desarrollo y morfogénesis, diferenciación celular, respuesta genotípica y/o fenotípica a drogas y ensayos de toxicidad. Si bien, la gran mayoría de los modelos más complejos utilizan matrices basadas en hidrogel o matrices sólidas, existen también algunos modelos 3D más básicos que involucran el agregado celular en suspensión sin el uso de sustratos basados en matriz. Este es el caso de los esferoides celulares, cuyos ejemplos más comunes de este tipo de cultivo incluyen cuerpos de embriones, esferoides tumorales, hepatosferas, y neuroesferas. Los métodos comunes sin matriz empleados para generar esferoides incluyen el uso de superficies de cultivo de células resistentes a la adherencia como son las Ultra-Low Attachment de Corning®, o manteniendo las células como cultivos en suspensión en los medios.

El tamaño total de los esferoides se limita a unos pocos cientos de micrómetros, más allá del cual se produce necrosis en el centro del cultivo. Suelen contener una población heterogénea de células expuestas a la superficie y profundamente enterradas, células proliferantes y no proliferantes, células bien oxigenadas y células hipóxicas (Frieboes *et al.*, 2006). Pueden analizarse fácilmente mediante imágenes usando luz, fluorescencia y microscopía confocal, lo que es una ventaja sobre los modelos de cultivo de células tridimensionales más complejos. Este tipo de cultivo puede ser una herramienta para contribuir en la reducción en pruebas con animales y por lo tanto, en ahorros económicos y convertirse en un modelo

poderoso para optimizar los fármacos candidatos para una mejor distribución y eficacia tisular, por otro lado, existe evidencia experimental que algunos fármacos pueden ser efectivos en 3D, pero, no en cultivo 2D, como se ha visto en algunas modalidades de tratamiento específicas, a menudo con el objetivo molecular expresado sólo o particularmente en un entorno tridimensional (Smejkal G. *et al.*, 2002; Barbone D. *et al.*, 2008).

Para permitir la generación eficiente de cultivos idénticos para múltiples series de ensayos independientes, es obligatoria una geometría bien definida ya que esto afecta su estado funcional que además de depender de su tamaño, es influenciado por el comportamiento individual del tipo celular del cual esté conformado, la densidad celular en el interior del esferoide y el tiempo de cultivo. Los cultivos de corto plazo pueden no estar lo suficientemente empaquetados como aquellos que se formaron durante un período más largo, pueden no haber expresado todo el patrón 3D auténtico en relación a la distribución matriz extracelular e interacciones célula-célula y célula-matriz, por lo que es necesario evaluar estas variables en cada modelo a utilizar.

### **1.9 Cocultivos esferoideales**

La formación *in vitro* de redes de células endoteliales y estructuras tubulares se ha dirigido principalmente a la investigación de angiogénesis en pruebas de sustancias pro y antiangiogénicas. Actualmente numerosos ensayos de angiogénesis de una variada complejidad han sido establecidos para identificar, evaluar y seleccionar agentes que afecten este proceso. Un modelo esferoide es de particular interés debido a su fácil manipulación y control. Un primer trabajo para evaluar la capacidad de formación de redes microvasculares en esferoides fue efectuada por Korff y Augustin (1998) quienes demostraron que el monocultivo esferoide de células endoteliales tenían un mayor grado de diferenciación comparado con aquellos en un ambiente bidimensional (Korff & Augustin, 1998). También demostraron que las células endoteliales mostraban un grado de maduración en un modelo de cocultivo esferoide con células de músculo liso (Korff T. *et al.*, 2001). Con el tiempo, demostró ser un buen modelo para evaluar la formación de nuevos brotes tubulares cuando se incrustaban en un gel de colágeno. Una aproximación diferente es el cocultivo de células endoteliales y fibroblastos en un entorno tridimensional.

Uno de los aspectos más críticos de los modelos 3D *in vitro* es la necesidad de imitar aspectos específicos del comportamiento celular *in vivo* para permitir la predicción del desarrollo y morfogénesis, diferenciación celular, respuesta genotípica y/o fenotípica a drogas y ensayos de toxicidad. En este aspecto, la morfología de una célula puede afectar su funcionalidad.

Los fibroblastos se definen en su gran medida por su ubicación. No existe un marcador confiable para su determinación y un estudio de análisis genético reveló que los fibroblastos son células bastante diferentes dependiendo de su tejido de origen (Chang *et al.*, 2002). Sin embargo, su función principal en todos los casos es la síntesis y el mantenimiento de la matriz extracelular. Por ejemplo, en

respuesta a heridas y durante el crecimiento tumoral se activan, secretando diversos colágenos, fibronectina, proteoglicanos de heparán sulfato y otros factores de crecimiento. En un esferoide, esto no es la excepción.

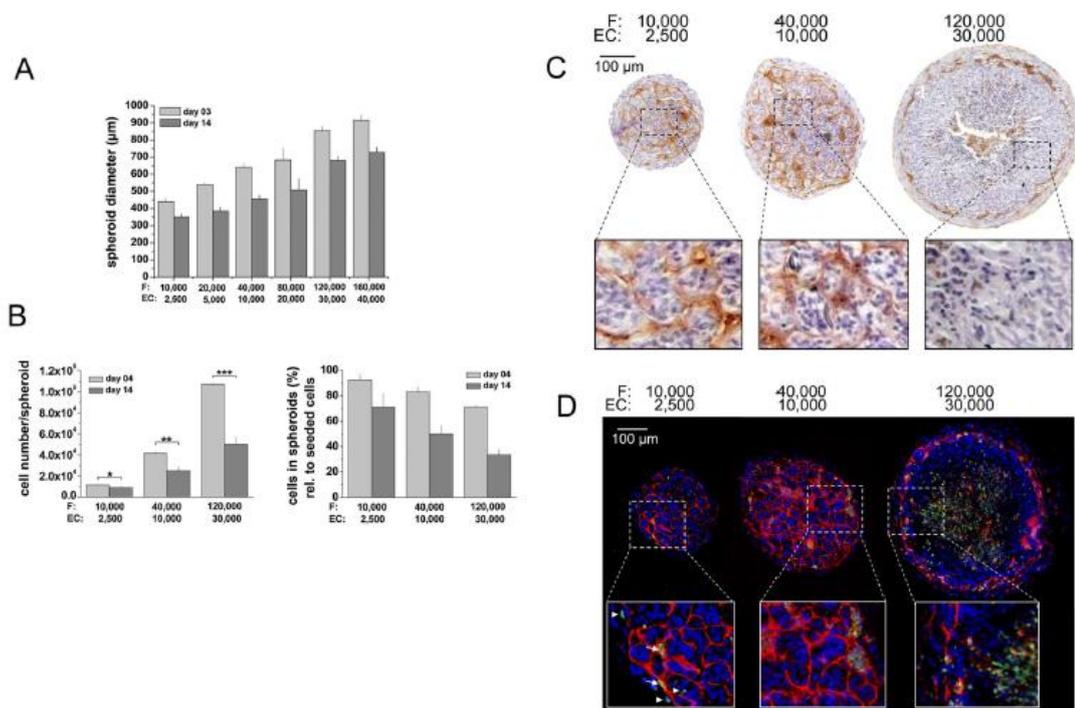
Además de estas funciones, los fibroblastos juegan un papel clave en la angiogénesis. Numerosos estudios han demostrado que estas células secretan factores de crecimiento angiogénicos solubles tales como VEGF (Kellouche *et al.*, 2007) o factor de crecimiento transformante beta (Paunescu *et al.*, 2011) entre otros. De estos antecedentes han derivado múltiples estudios *in vitro* con el fin de examinar el rol de los fibroblastos en la tubulogénesis de células endoteliales (Montesano R. *et al.*, 1993; Nakatsu *et al.*, 2003; Eriksson M. *et al.*, 2006). Todos estos estudios evidenciaron promover la proliferación de células endoteliales y la formación de lumen. Otro estudio reportó que la formación de microtubos de células endoteliales en geles 3D de fibrina es estrictamente más dependiente de la relación celular entre fibroblastos y células endoteliales que de éstos últimos con el medio en donde se encuentren (Griffith *et al.*, 2005). Esto fue confirmado en un modelo 3D de cultivo en donde identificaron que una combinación de proteínas derivadas de fibroblastos promueve el brote de células endoteliales y es necesario para la formación de lumen de células endoteliales, así como también para el aumento de la rigidez de la matriz extracelular (Newman A. *et al.*, 2011).

Se ha demostrado la influencia de la matriz extracelular en las fuerzas de atracción generadas por células de cultivos bidimensionales (Lo C. *et al.*, 2000). RhoA, una pequeña GTPasa está implicada en la regulación de las fuerzas de tracción generadas por las células, así como también se le ha asociado a la morfogénesis capilar (Shiu *et al.*, 2004). Ya que este proceso es complejo y dinámico dependiendo de la degradación de la matriz celular circundante, la proliferación y migración de las células endoteliales, y la diferenciación de éstas a redes tubulares microscópicas, es que la expresión y síntesis de esta proteína podría eventualmente verse alterada en un ambiente tridimensional lo que otorga ventajas a este modelo por sobre uno en monocapa. Adicionalmente la incorporación de fibroblastos cardíacos al cocultivo provee una fuente natural de componentes de la matriz extracelular y de factores pro-angiogénicos, lo que permite que las células endoteliales se diferencien e inicien un proceso similar a la morfogénesis capilar *in vivo*.

En estudios previos se ha iniciado esferoides con diferentes mezclas de relaciones celulares de fibroblastos/células endoteliales usando un número fijo de fibroblastos de  $1 \times 10^4$  por pocillo en una placa de 96 pocillos revestida con agarosa (Kunz-Schughart *et al.*, 2006). En este estudio se escogió la relación 4:1 fibroblastos / células endoteliales para evaluar el máximo tamaño esferoidal que puede ser logrado sin perder la viabilidad, formación de redes y tubulogénesis (Eckermann *et al.*, 2011). De ese estudio derivaron los siguientes resultados mostrados en la figura 10.

Se evidencia el aumento del diámetro en función del número de células incorporadas en los esferoides y una pérdida de éste relacionada con el tiempo de cultivo (Figura 10.A). Se observa una pérdida de tamaño durante el cultivo para todas las mezclas de células en los esferoides, del mismo modo se refuerza un

incremento del tamaño relacionado con el número de siembra y una pérdida de éste en función del tiempo (Figura 10.B). Estos esferoides fueron procesados histológicamente al ser seccionados y teñidos para visualizar la red de células endoteliales mantenida después de 14 días en el cultivo. Todas las mezclas de células evidenciaron formación de red de células endoteliales. Sin embargo, la combinación 10.000 EC y 40.000 fibroblastos mostró al cabo de 14 días un mejor comportamiento al no evidenciar centros necróticos, menos células apoptóticas en la periferia y una formación de red desde el centro del esferoide hasta la periferia (Figura 10.C, 10.D).



**FIGURA 10.** La formación de estructuras tubulares y supervivencia de células endoteliales en esferoides de fibroblastos / Huvec dependen de la densidad de siembra y el tamaño del esferoide, respectivamente. (Eckermann *et al.*, 2011)

El tamaño máximo de cocultivos esferoidales con redes de células endoteliales viables en toda la periferia y las áreas centrales es entre 600 y 650 µm de diámetro en el día 3 de cultivo y requiere la siembra de 10.000 células endoteliales y 40.000 fibroblastos. El conteo de células y el tamaño de los esferoides disminuyen significativamente con el tiempo, sin embargo, la red de células endoteliales en el día 14 de cultivo se mantiene visible y viable.

De acuerdo con la información anterior y considerando: i) el análisis de los estudios del rol del endotelio en la inflamación y angiogénesis durante la etiopatogenia de la cardiopatía chagásica crónica, ii) los descubrimientos de moléculas propias del parásito que afectan la formación de nuevos vasos sanguíneos, iii) las necesidades de búsqueda de nuevas estrategias terapéuticas en la infección por *T. cruzi*, iv) los estudios previos de simvastatina en relación a la angiogénesis y v) los avances en los modelos de evaluación de estos procesos llevaron a elaborar la siguiente hipótesis:

## 2. HIPOTESIS

Simvastatina induce migración de células endoteliales y formación de microtubos en un modelo de cocultivo celular tridimensional esferoide infectado con *Trypanosoma cruzi*.

### 3. OBJETIVOS

#### 3.1 Objetivo general:

Evaluar el efecto de simvastatina sobre la actividad angiogénica en esferoides de células endoteliales microvasculares cardíacas humanas y fibroblastos cardíacos humanos infectados con *T. cruzi*.

#### 3.2 Objetivos específicos:

1. Caracterizar morfológicamente el modelo esferoidal de células endoteliales microvasculares cardíacas humanas y fibroblastos cardíacos humanos infectados con *T. cruzi*.
2. Evaluar el efecto de simvastatina sobre la formación de microtubos por migración de células endoteliales desde un cocultivo esferoidal constituido por células endoteliales microvasculares cardíacas humanas y fibroblastos cardíacos humanos, e infectado con *T. cruzi*.

## 4. MATERIALES Y MÉTODOS

### 4.1 Líneas celulares

#### 4.1.1 Células endoteliales

Las células HUVEC (C-015-10C, Cascade Biologics™ Invitrogen) son células endoteliales primarias de vena umbilical de múltiples donadores. Las células fueron cultivadas en Medium 200 (Gibco® M-200-500) suplementado con LSGS (Low serum growth supplement, fetal bovine serum 2%v/v hidrocortisona 1µg/mL, factor de crecimiento epidermal 10 ng/mL; factor de crecimiento para fibroblastos 3 ng/mL y heparina 10µg/mL) (Gibco® S-003-10) en un ambiente a 37°C y 5%CO<sub>2</sub>.

Las células EA.hy926 (ATCC® CRL2922™) presentan funciones características de células endoteliales, producto de la fusión de células de vena umbilical humana primaria con un clon de A549 resistente a tioguanina y expuesta a polietilenglicol. Las células fueron cultivadas en Iscove's Modified Dulbecco's Medium (IMDM, Biological industries # 01-058-1) suplementado con suero fetal bovino al 10% v/v y PenicilinaG/Estreptomicina sulfato (100 U/mL/100 mg/mL), a 37°C y 5%CO<sub>2</sub>.

Las células HMVEC-C (Lonza CC-7030™) son células endoteliales microvasculares cardíacas humanas. Se cultivaron en monocapa con medio de crecimiento endotelial basal-2 (EBM™-2 Lonza) suplementado con factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF), factor de crecimiento de fibroblastos B (bFGF), factor de crecimiento epidermal (EGF) y 5% de suero fetal bovino en un ambiente con 5% de CO<sub>2</sub> y a 37°C.

#### 4.1.2 Fibroblastos

Las células HFF-1 (ATTC® SCRC-1041™) son fibroblastos de prepucio humanos. Se cultivaron en medio DMEN suplementado con 5% de suero fetal bovino en un ambiente con 5% de CO<sub>2</sub> y a 37°C.

Las células NHCF-V (Lonza CC-2904™) son fibroblastos cardíacos humanos de ventrículo normales. Se cultivaron en medio basal (SCBM) suplementado con factor de crecimiento de fibroblastos B (bFGF) y 5% de suero fetal bovino en un ambiente con 5% de CO<sub>2</sub> y a 37°C.

#### 4.1.3 Obtención de parásitos

Los tripomastigotes de *T. cruzi* (clon Dm28c) fueron obtenidos de los sobrenadantes de cultivos VERO previamente infectados en una relación célula:parásito 1:5 durante 24 horas. Al cuarto día post-infección, los tripomastigotes liberados fueron recolectados para evaluar viabilidad y conteo para las siguientes infecciones. Al día 3 de formación del esferoide, éstos fueron incubados por 24 horas con tripomastigotes en una relación 1:3 con respecto al total de células en el cocultivo.

## **4.2 Cocultivo esferoidal**

Para evaluar el tratamiento farmacológico de simvastatina sobre la actividad angiogénica se utilizó un modelo de cocultivo en esferoides para obtener una estructura y morfología tridimensionales de dicha interacción celular. La formación del esferoide se realizó siguiendo un protocolo modificado de Eckermann et. al (2011) en el cual se mezclan células endoteliales con fibroblastos en una proporción 1:4, mediante centrifugación 100g, en placas de 96 pocillos de fondo plano previamente cubiertas con agarosa a 80°C (50 uL de agarosa al 1,5% en medio RPMI por pocillo). Para mantener los esferoides se utilizó medio de cultivo EBM-2, correspondiente a las células endoteliales, suplementado con 5% de suero fetal bovino, factor de crecimiento epidermal (EGF), factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF), factor de crecimiento de fibroblastos B (bFGF). Los esferoides se cultivaron a 37°C en un ambiente con 5% de CO<sub>2</sub> por 3 días, se cambió el medio al día 3 y luego cada día hasta el día 7.

## **4.3 Crecimiento de esferoides**

El crecimiento de los esferoides se determinó a través del diámetro calculado al capturar microfotografías en contraste de fase con el objetivo 4X a los días 3, 4 5 y 6 utilizando un microscopio invertido (Axiovert 200) acoplado a una cámara Nikon D3400. Para determinar el diámetro de los esferoides se analizaron las imágenes obtenidas utilizando ImageJ v.1.52<sup>a</sup> software (National Institutes of health, Bethesda, MD).

## **4.4 Reconstrucción del modelo tridimensional por microscopía confocal**

La reconstrucción del modelo se llevó a cabo mediante tinciones por separado con Celltracker™ Green para NHFC y Celltracker™ Orange para HMVEC. Posterior a ello se procedió a la formación del esferoide como se describe previamente y se evaluó al día 6 de cultivo mediante microscopía confocal la distribución tridimensional de las células, las dimensiones y la estructura 3D del cocultivo.

## **4.5 Tratamiento farmacológico de los esferoides.**

A los 3 días de formados los esferoides, se incubaron durante 24 horas con tripomastigotes sanguíneos de *T. cruzi* (Dm28c) en una proporción 1:3. Luego, fueron lavados y traspasados a una placa de 96 pocillos, a razón de un esferoide por pocillo con 50 uL de Matrigel® y 200 uL de medio EBM-2 enriquecido con factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF) y factor de crecimiento de fibroblastos b (bFGF), necesarios para la formación de microrredes tubulares. A continuación, se incubó con simvastatina 5, 50 y 500 nM (disuelta en DMSO), hasta por 72 horas, aplicadas al medio y sin cambiarlo. El crecimiento de los tubos se evaluó usando contraste de fase mediante un microscopio invertido (Axiovert 200) acoplado a una cámara Nikon D3400.

#### **4.6 Formación de microtubos en matrigel**

Se evaluó el crecimiento de microtubos a los días 5, 6 y 7 mediante microfotografías en contraste de fase utilizando un microscopio invertido (Axiovert 200) acoplado a una cámara Nikon D3400. La longitud de los microtubos se midió usando el software ImageJ v.1.52<sup>a</sup> software (National Institutes of health, Bethesda, MD). Para ello, se ajustó la escala por defecto a una que tuviese relación con el diámetro de los esferoides. Esto se hizo comprobando la relación existente entre la unidad de medida por defecto (píxeles) y la unidad micrómetro mediante la medición de un cuadrado de la cámara de Neubauer. Una vez ajustada la escala, se midió el largo de 12 brotes en el sentido de las manecillas del reloj desde el borde del esferoide hasta donde se aprecie visiblemente, a través del software. Por cada condición, se midieron 12 tubos por esferoide de un total de 3 esferoides diferentes. Las imágenes fueron tratadas con el software Adobe Lightroom v 7.8 con el fin de modificar sólo contraste y brillo, para ser mejor apreciadas. Fueron tratadas todas por igual.

#### **4.7 Análisis estadístico**

Se consideró estadísticamente significativo un valor de  $p < 0.05$ . En primer lugar, se aplicó un ensayo preliminar para calcular la distribución normal de datos utilizando el análisis de D'Agostino-Pearsons y Shapiro-Wilk y el tamaño de muestra apropiado de cada experimento. Los datos se representaron como la media  $\pm$  SEM de  $n$  calculada previamente. Dado que los datos tienen un comportamiento normal, se aplicó un análisis ANOVA de dos vías con los *post-test* de Tukey's mediante el cual se comparó el efecto de los diferentes tratamientos con el respectivo control infectado, pero no tratado, para evaluar el impacto de simvastatina sobre la actividad angiogénica. Todos los análisis estadísticos se realizaron utilizando el software GraphPadPrism v6.

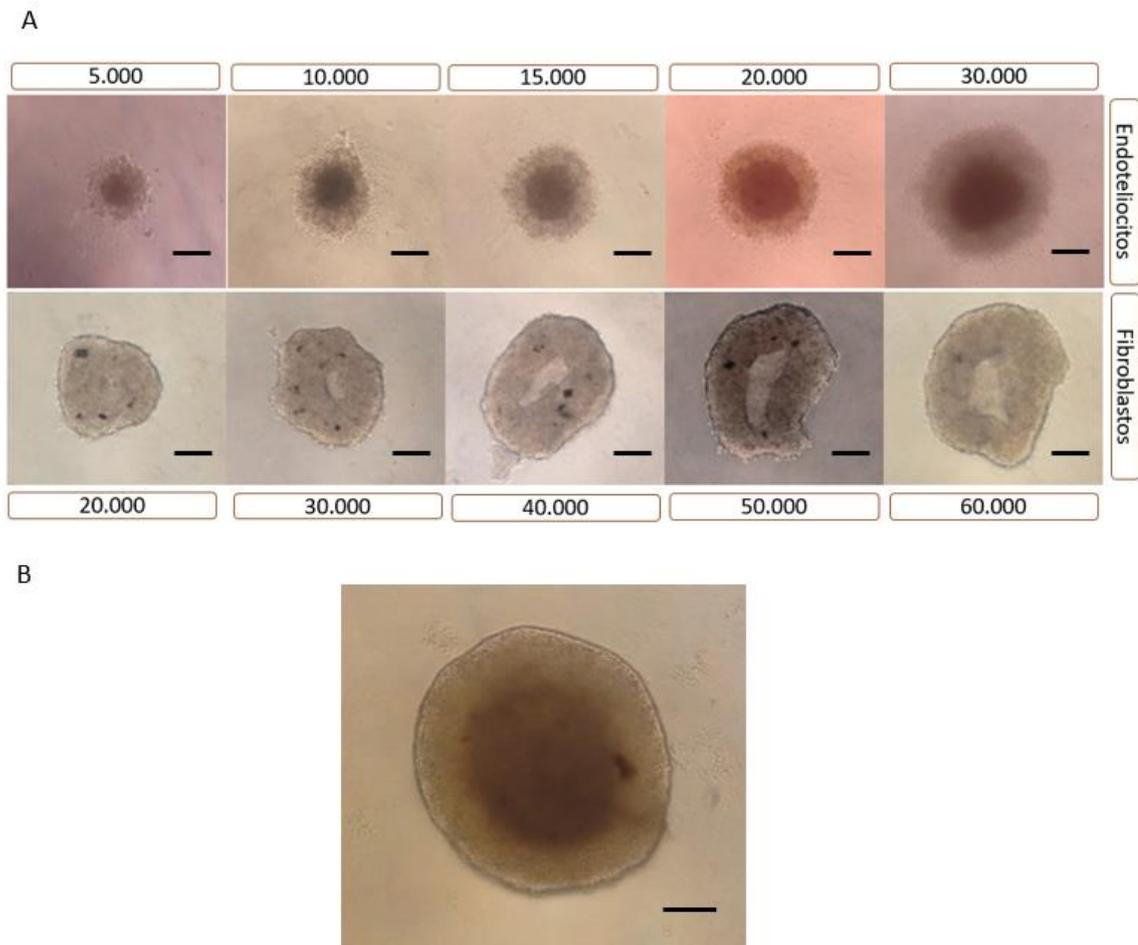
## 5. RESULTADOS

**Objetivo 1** Caracterizar morfológicamente el modelo esferoidal de células endoteliales microvasculares cardíacas humanas y fibroblastos cardíacos humanos infectados con *T. cruzi*.

Para iniciar la caracterización morfológica del modelo esferoidal se realizaron pruebas preliminares con células endoteliales humanas de cordón umbilical (HUVEC) y fibroblastos de prepucio (HFF-1) en cantidades crecientes de células, que fueron desde  $5 \times 10^3$  hasta  $3 \times 10^4$  en el caso de los endotelios y desde  $2 \times 10^4$  hasta  $6 \times 10^4$  en el caso de los fibroblastos. Los esferoides fueron inicialmente formados en monocultivo con el fin de evaluar la capacidad de formar una estructura esférica por separado, para luego elegir la combinación determinada en la revisión bibliográfica (Figura 11 A). Se observó al día 3 de cultivo que las HUVEC por si solas e independiente de la cantidad de células, formaron estructuras esféricas bien definidas. Sin embargo, los fibroblastos formaron estructuras tridimensionales, pero con formas indefinidas e inestables en el tiempo.

A continuación, se probaron 3 combinaciones diferentes, en la proporción 1:4 tal y como se ha reportado previamente. De esta manera se evaluaron las siguientes cantidades:  $5 \times 10^3$  (HUVEC)/ $2 \times 10^4$  (Fibroblastos),  $1 \times 10^4$  (HUVEC)/ $4 \times 10^4$  (Fibroblastos),  $2 \times 10^4$  (HUVEC)/ $8 \times 10^4$  (Fibroblastos). La forma más definida se logró con la segunda combinatoria al día 3 de iniciado el cultivo (Figura 13 B) corroborando lo descrito por Eckermann y colaboradores en su caracterización previa del modelo (Eckermann *et al.*, 2011). En efecto, en la figura 11 B se aprecia una estructura de borde definidamente circular con diferente contraste entre el centro y la periferia del esferoide.

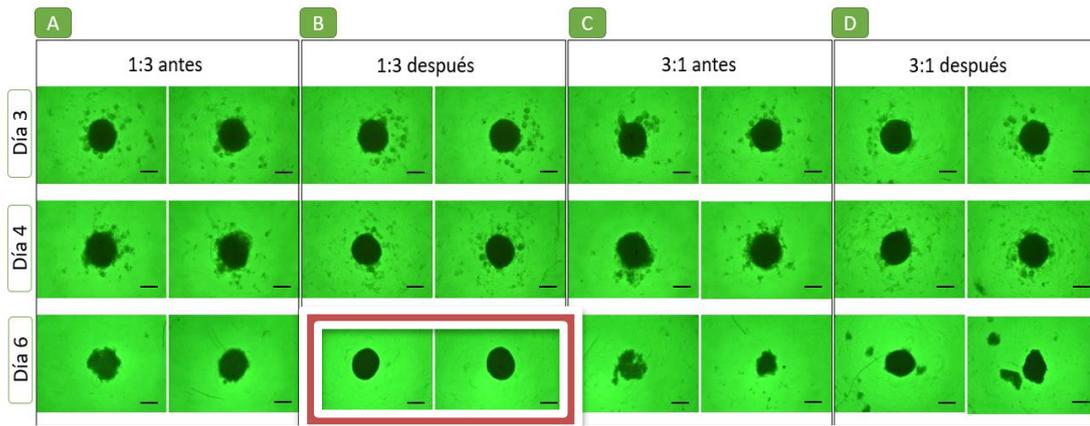
Dado que el modelo requiere la presencia del *T. cruzi*, se evaluó la modalidad de infección en un cocultivo esferoide de una línea celular endotelial (EA.hy926) y HFF-1 con el objeto de esclarecer la mejor opción para infectar las células endoteliales, previo a la formación del esferoide o una vez formado a los 3 días de iniciado el cultivo. El uso de la línea EA.hy926 facilita el cultivo por cuanto es inmortalizada y de más fácil manejo que las HUVECs y por lo tanto, los estudios posteriores fueron con esta misma línea celular. Los cocultivos se infectaron con una multiplicidad parásito/total de células del cocultivo ( $5 \times 10^4$  células) 3:1 y 1:3, previo, y 3 días después de iniciado el cultivo. La integridad del esferoide se evaluó mediante microfotografías en contraste de fase en un microscopio invertido hasta los 6 días de iniciado el cultivo. En la figura 12 se aprecia una pérdida de la integridad en la razón 3:1, ya sea antes o posterior a la formación de la estructura 3D. Mientras que en la relación 1:3 se mantiene, aparentemente, la integridad del esferoide posterior a la formación del modelo tridimensional (Figura 12 B). A raíz de este resultado se siguió trabajando el modelo de infección con el esferoide ya formado y una multiplicidad de infección de 1:3.



**FIGURA 11 Formación de esferoides en monocultivo y cocultivo.**

**(A)** Esferoides monocultivo en cantidades crecientes de células endoteliales humanas de vena de cordón umbilical (HUVEC) y fibroblastos de prepucio (HFF-1)

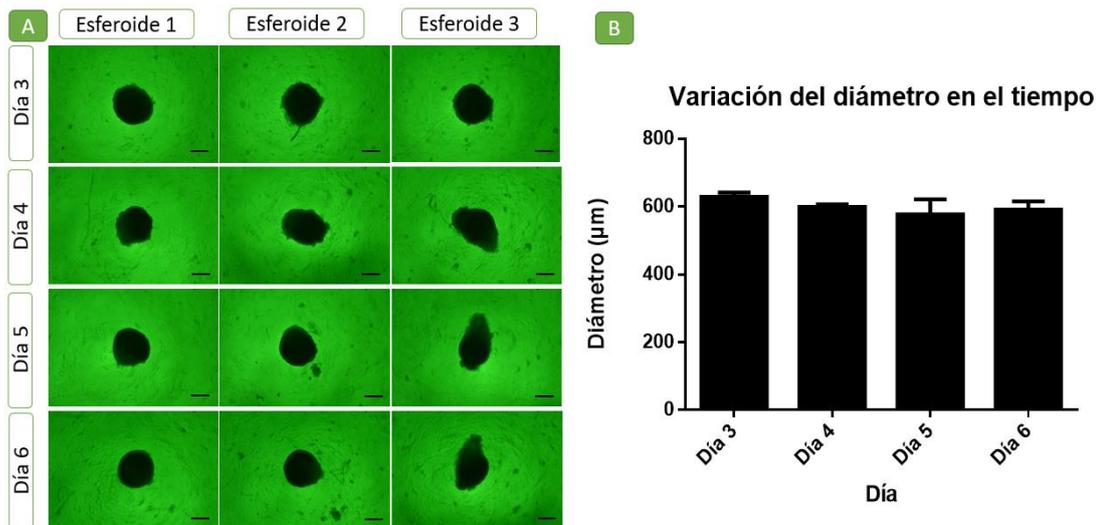
**(B)** Esferoide cocultivo razón 1:4 HUVEC/HFF-1 usando  $1 \times 10^4 / 4 \times 10^4$  respectivamente. Los esferoides fueron sembrados sobre placas de 96 pocillos recubiertas con agarosa 1,5% otorgándole una superficie no adherente para favorecer la unión entre las células. Las imágenes corresponden a microfotografías representativas tomadas al día 3 de iniciado el cultivo utilizando un aumento 10X. La barra corresponde a 100  $\mu\text{m}$



**FIGURA 12 Establecimiento del modelo de cocultivo 3D infectado con *T. cruzi*.** Esferoides cocultivo de EA.hy926 y HFF-1 en relación 1:4, cantidad  $1 \times 10^4/4 \times 10^4$  respectivamente. **(A) y (C)** Para la condición “antes” se infectaron las células endoteliales previo a la formación del esferoide. **(B) y (D)** Para la condición “después” los esferoides se infectaron a los 3 días después de iniciado el cultivo. Las imágenes corresponden a microfotografías representativas tomadas al día 3, 4 y 6 de iniciado el cocultivo utilizando un aumento 4X. La barra corresponde a  $300 \mu\text{m}$

Considerando que los esferoides construidos en las condiciones reportadas demostraron ser estables y que no se dañaron con la infección por *T. cruzi*, se procedió a cocultivar células endoteliales microvasculares cardíacas humanas (HMVEC) y fibroblastos cardíacos humanos normales (NHFC). Estos esferoides se denominaron esferoides cardíacos, pues, aunque carecen de cardiomiocitos, se logra hacer una aproximación más fidedigna a un modelo tridimensional de dos de los principales constituyentes del tejido cardíaco humano. El efecto de simvastatina sobre la actividad angiogénica en presencia de la infección por *T. cruzi* se evaluó en esta estructura artificial.

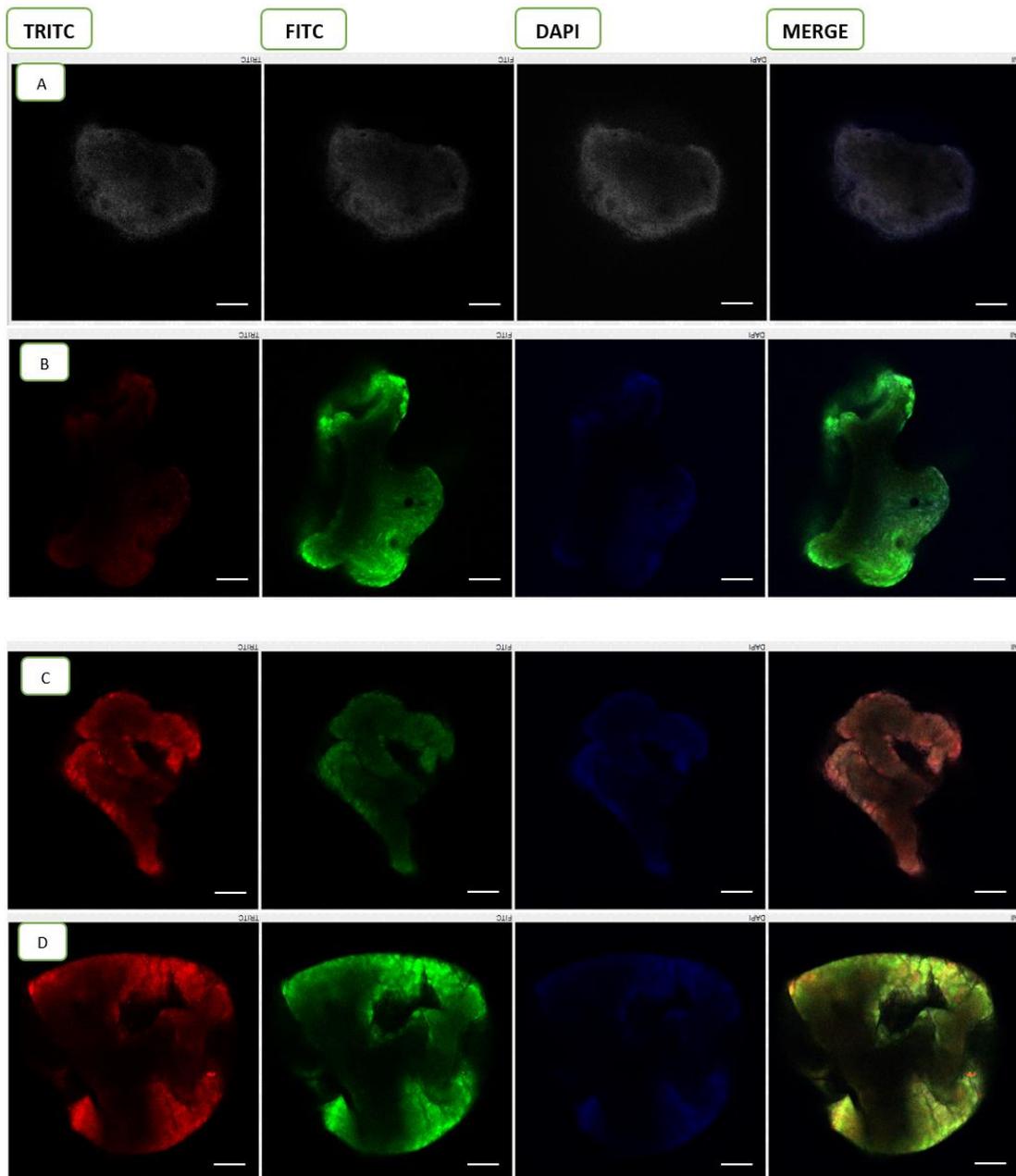
Los esferoides cardíacos se formaron usando una proporción 1:4 ( $1 \times 10^4/4 \times 10^4$ ) de HMVEC y NHFC y se controló su crecimiento desde el día 3 hasta el día 6 de formación (Figura 13 A). El diámetro del esferoide, que fue de  $629 \pm 13 \mu\text{m}$  al día 3 y  $591 \pm 24 \mu\text{m}$  al día 6, fue relativamente constante durante este período de tiempo (Figura 13 B) ( $p > 0.05$ ) sin diferencia significativa cada día en comparación con el día 3 y entre ellos, mediante un análisis ANOVA de una vía



**FIGURA 13 Evaluación del diámetro de esferoides cardíacos en el tiempo.** (A) Se evaluó el diámetro de 3 esferoides cardíacos compuestos por células HMVEC y NHFC en una proporción 1:4 en los tiempos indicados en la figura, y se midió el diámetro usando microfotografías tomadas en microscopio de contraste de fase con un aumento de 4X. Para la determinación del diámetro se usó el software ImageJ v1.52<sup>a</sup>. La barra representa 300 µm. (B) Cuantificación del diámetro expresado como el promedio  $\pm$  SEM de 3 esferoides individuales. No hubo diferencias significativas por análisis de ANOVA de una vía

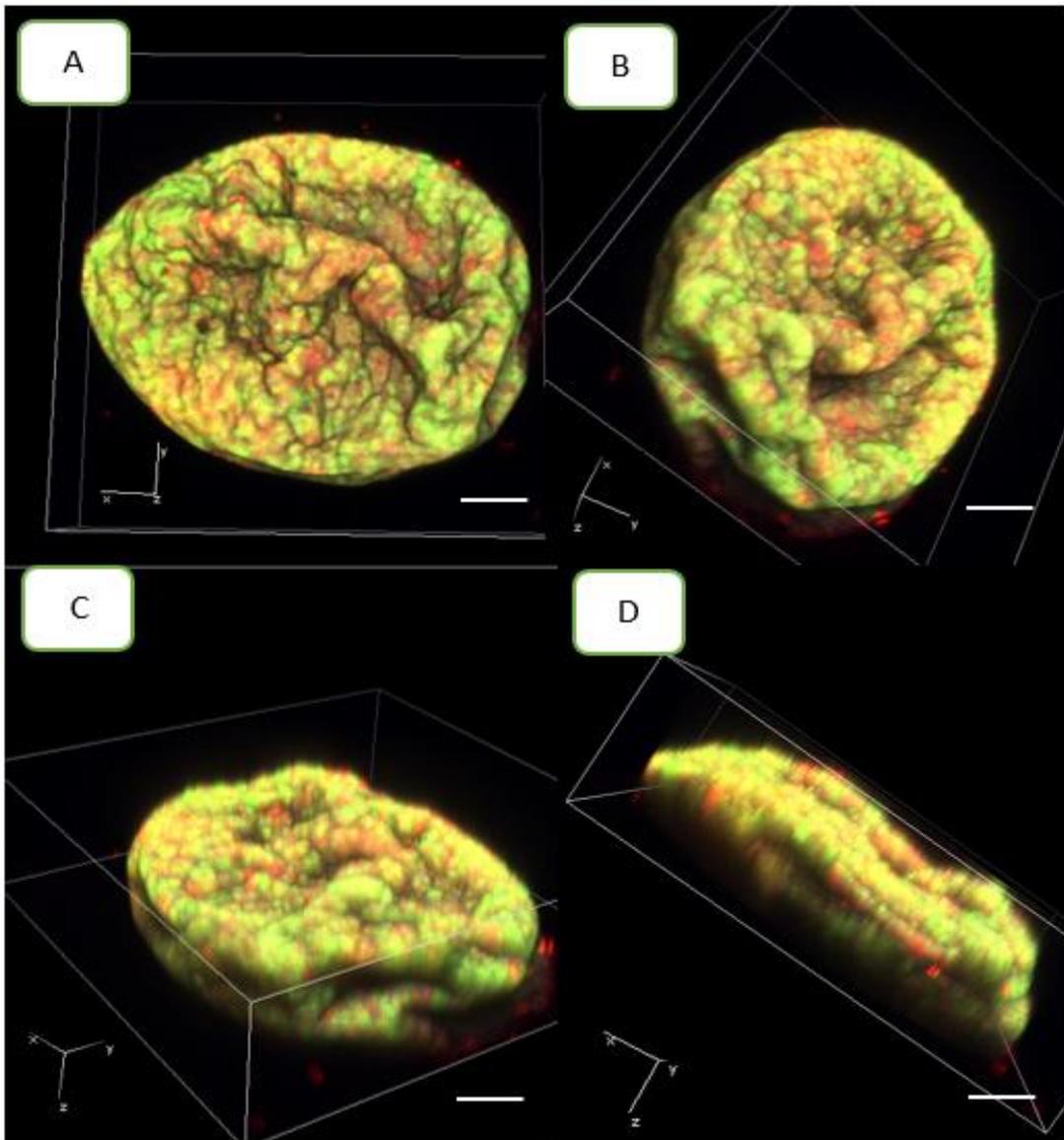
Una vez establecidas las condiciones óptimas de formación del esferoide cardíaco, se procedió a caracterizarlo morfológicamente mediante una reconstrucción tridimensional. Para ello se formaron esferoides cardíacos con las células previamente teñidas con Celltracker™ Green para NHFC y Celltracker™ Orange para HMVEC. La formación del esferoide se evaluó al día 6 mediante microscopía confocal para analizar la distribución tridimensional de las células, y las dimensiones y estructura 3D del cocultivo.

La figura 14 muestra las condiciones de estandarización de emisión de fluorescencia de los distintos fluoróforos, evidenciando. En la figura 14 A corresponde a la mínima intensidad de autofluorescencia de un esferoide representativo. Las imágenes muestran que las células no emiten intensidad relevante de otro canal que no sea con el cual fueron teñidas previamente. Llama la atención que existe predominio de la señal verde lo que explica una mayor presencia de fibroblastos, que es esperable dada la proporción celular en la que fue construido el esferoide.



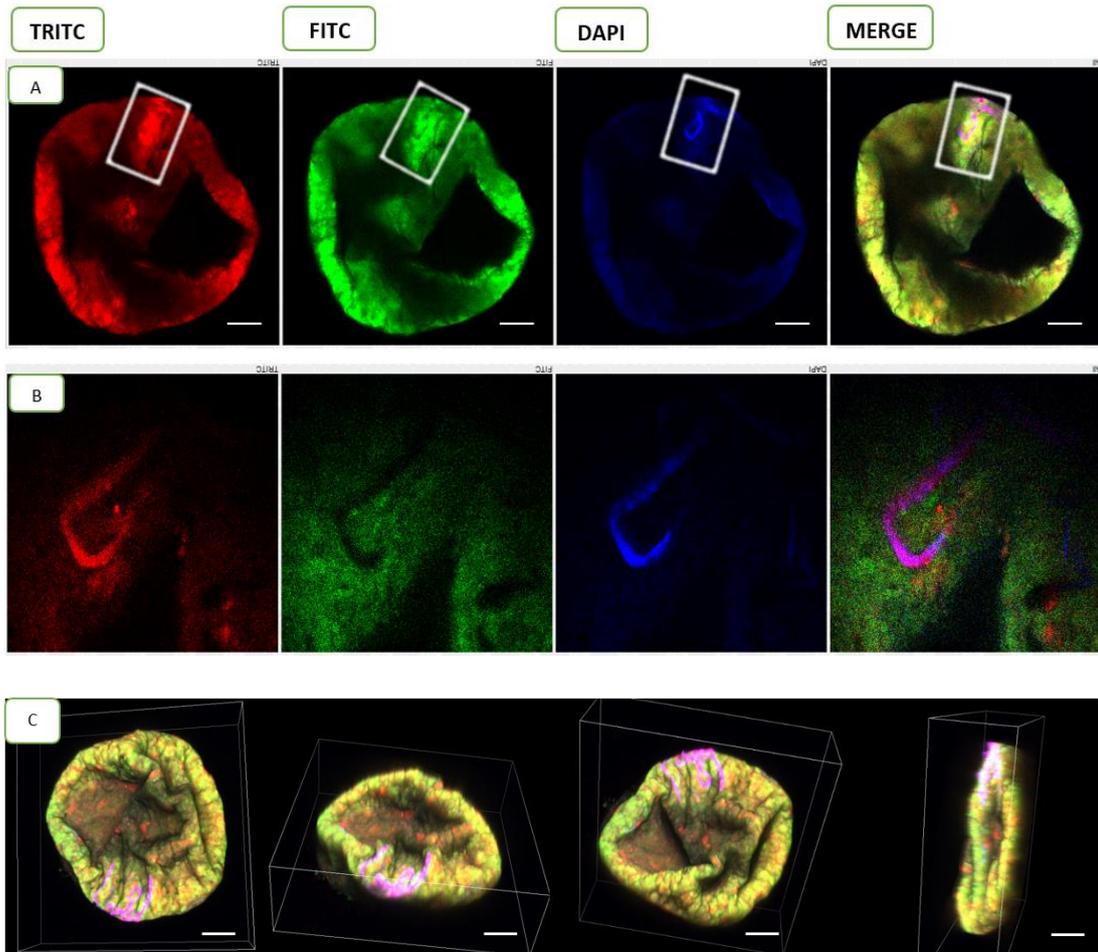
**FIGURA 14 Evaluación de la distribución de fibroblastos y células endoteliales en esferoides cardiacos.** Las células endoteliales (HMVEC) y los fibroblastos cardíacos (NHFC), proporción 1:4, fueron teñidas con Celltracker™ Orange y Celltracker™ Green, respectivamente. La evaluación de la distribución tridimensional se efectuó al día 6 de iniciado el cocultivo usando una resolución de de 1/8 en el microscopio confocal. **(A)** Esferoide sin tinción. **(B)** Esferoide teñido con Celltracker™ Green CMFDA (5-chloromethylfluorescein diacetate). **(C)** Esferoide teñido con Celltracker™ Orange CMTMR (5-(and-6)-(((4-chloromethyl)benzoyl)amino)tetramethylrhodamine). **(D)** Esferoide con la tinción de ambos Celltracker™. La intensidad de excitación en A fue disminuida al mínimo a fin de evidenciar emisión significativa en B, C y D. De derecha a izquierda se pueden ver los diferentes canales de fluorescencia TRITC, FITC, DAPI individualmente y la colocación de los 3 en una sola imagen. La barra representa 100  $\mu$ m

La figura 15 es representativa de la reconstrucción 3D de un esferoide cardíaco, cuyo volumen fue, en promedio de  $0,076 \pm 0,003 \text{ mm}^3$ , presentando un diámetro de  $633.83 \mu\text{m}$  lo que concuerda con los diámetros obtenidos en la figura 13. Además, como se aprecia en las figuras 14 y 15, la distribución celular es aleatoria, reflejada en la localización heterogénea de las emisiones fluorescentes aparentes.



**FIGURA 15 Reconstrucción 3D del esferoide. (A) hasta (D) Planos de visualización del esferoide.** Las células endoteliales (HMVEC) y los fibroblastos cardíacos (NHFC), proporción 1:4, fueron teñidas con CelltrackerTM Orange y CelltrackerTM Green, respectivamente. La evaluación de la distribución tridimensional se efectuó al día 6 de iniciado el cocultivo usando una resolución de de 1/8 en el microscopio confocal. La barra representa  $100 \mu\text{m}$ .

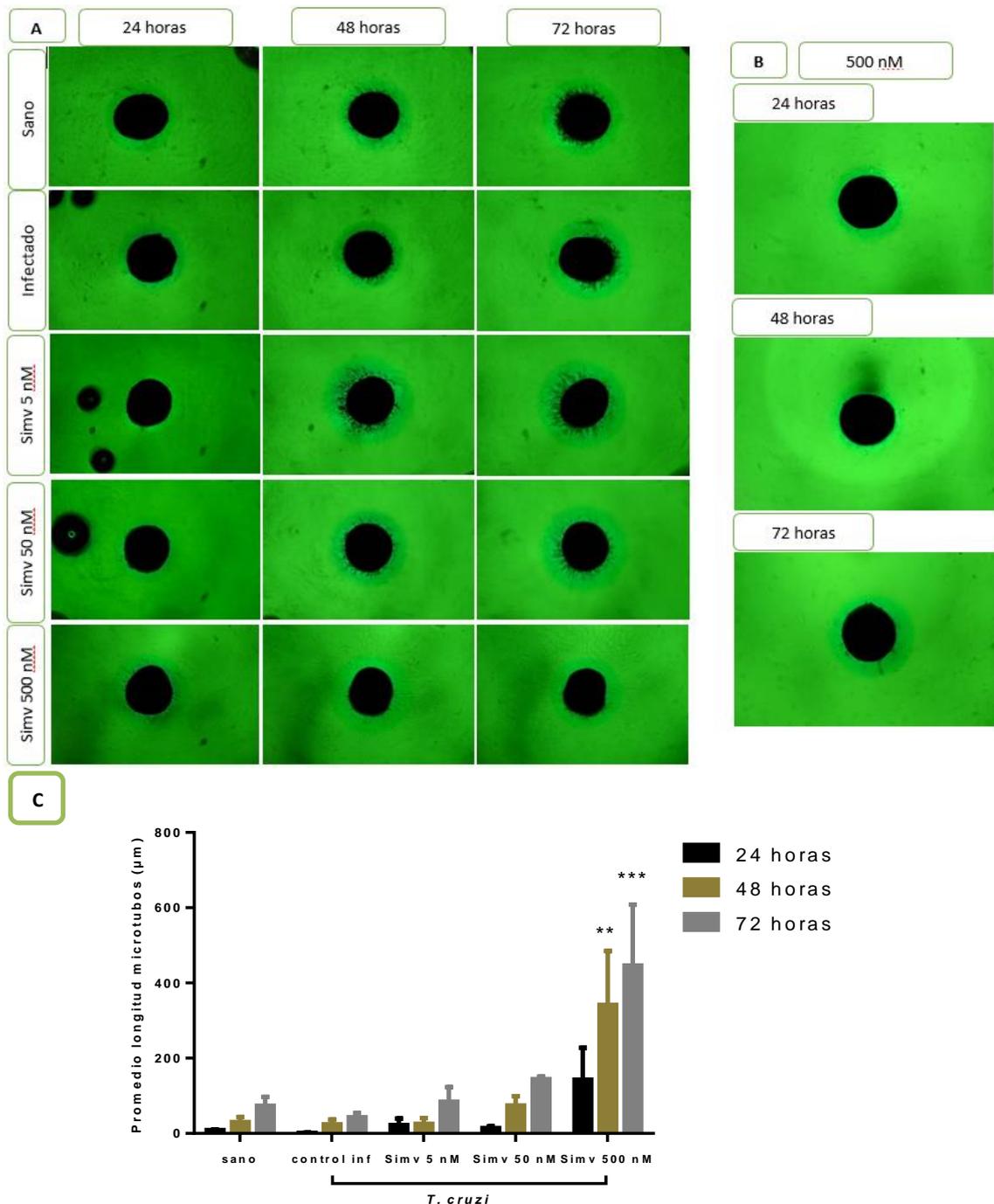
Para evaluar la presencia del parásito en el esferoide cardiaco, se infectó con tripomastigotes de *T. cruzi* teñidos con DAPI. La tinción con DAPI no afecta la viabilidad de los parásitos. A los 3 días postinfección (d.p.i) fueron lavados y la presencia de amastigotes al interior de las células fue determinada por microscopía confocal. Usando los ajustes empleados en la figura 14, se obtuvieron las microfotografías de la figura 16 para evaluar el establecimiento de la infección. La figura 16 también representa la evaluación del alcance de la infección al interior de la estructura esferoidal. Las imágenes muestran que la infección es selectiva por células endoteliales (Figura 16 B). Además, la infección se localiza no sólo en la superficie del esferoide sino también al interior de éste (Figura 16 C).



**FIGURA 16** Infección de esferoides cardíacos con tripomastigotes de *T. cruzi*. Las células endoteliales (HMVEC) y los fibroblastos cardíacos (NHFC), proporción 1:4, fueron teñidas con Celltracker™ Orange y Celltracker™ Green, respectivamente y los tripomastigotes de *T. cruzi* (Dm28c) fueron teñidos con DAPI previo a la infección. Los esferoides fueron incubados con tripomastigotes sanguíneos al día 3 de iniciado el esferoide cardíaco y por 24 horas. Posterior a ello fueron lavados y evaluados por microscopía confocal a los 3 d.p.i. mediante cortes Z de 7,00  $\mu\text{m}$  (28 imágenes) con un rango de 183,93  $\mu\text{m}$  de profundidad. Las imágenes poseen una calidad de 1/8 de resolución. Las imágenes de la figura **(A)** (20X) y **(B)** (100X) corresponden al corte 15/28 con 98  $\mu\text{m}$  de profundidad. **(C)** Reconstrucción 3D del esferoide infectado mostrando cuatro perspectivas de visualización diferentes. Las dimensiones son: ancho 633,86  $\mu\text{m}$ , alto 633,86  $\mu\text{m}$  profundidad 189,00  $\mu\text{m}$ . La barra representa 100  $\mu\text{m}$

**Objetivo 2.** Evaluar el efecto de simvastatina sobre la formación de microtubos por migración de células endoteliales desde un cocultivo esférico constituido por células endoteliales microvasculares cardíacas humanas y fibroblastos cardíacos humanos, e infectado con *T. cruzi*.

Para evaluar el efecto de simvastatina sobre la formación de microtubos se utilizaron los esferoides cardíacos infectados con *T. cruzi* e incubados con simvastatina hasta por 72 horas. La figura 17 A muestra el progreso en la migración de las células endoteliales y la generación de redes microtubulares a las 24, 48 y 72 horas. Este progreso es paulatino en los esferoides sanos. Llama la atención que en el esferoide infectado la formación de tubos ocurre en un solo lado, siendo más evidente a las 72 horas. A su vez, se observan proyecciones endoteliales a lo largo de toda la circunferencia del esferoide con simvastatina, siendo apreciablemente mayor a la concentración de 500 nM. La figura 20 B corresponde a un esferoide monocultivo de NHFC, en el cual no se evidenció migración o formación de ningún tipo de estructura externa al esferoide, lo que da cuenta que los resultados de la figura 17 A corresponden a células endoteliales y no a fibroblastos. En la figura 17 C se muestra el análisis cuantitativo del largo de los tubos comparado con el control infectado. Se puede apreciar un aumento significativo en la migración de células endoteliales a concentración 500 nM de simvastatina, tanto a 48 como 72 horas de incubación, en esferoides infectados con *T. cruzi*.



**FIGURA 17** Efecto de simvastatina sobre la formación de microtubulos de esferoides cardiacos infectados con *Trypanosoma cruzi*. Los esferoides fueron formados mediante cocultivo de células endoteliales (HMVEC) y fibroblastos cardiacos (NHFC), proporción 1:4. A los 3 días, fueron incubados con tripomastigotes sanguíneos durante 24 horas y a continuación, traspasados a un pocillo con matrigel e incubados con simvastatina a las concentraciones y tiempos indicados en la figura. **(A)**. Comparación bajo las mismas condiciones, de monocultivos esferoides de NHFC **(B)**. Relación cuantitativa de Simv a diferentes concentraciones con respecto al control infectado **(C)**. Se midieron 12 microtubulos por esferoide (n=3) usando el software ImageJ v.1.52<sup>a</sup>. \*\*  $p < 0,01$ ; \*\*\*  $p < 0,0001$  analizado por ANOVA de dos vías y post test de Tuckey

## 6. DISCUSIÓN

Los esferoides como modelo de cultivo tridimensional en suspensión proveen ventajas significativas sobre una monocapa celular en comportamientos como la unión celular, su expansión y crecimiento, su morfología y polaridad, expresión de genes y proteínas, viabilidad, proliferación, diferenciación, metabolismo celular y respuesta a estímulos (Sanyal, 2014). A su vez proporciona un apoyo fundamental en los esfuerzos por aplicar los principios de Russell y Burch (Russell & Burch, 1959) en el trabajo experimental en animales como el tener antecedentes *in vitro* más sólidos que justifiquen y reduzcan relevantemente la utilización de seres vivos con mayor capacidad de experimentar dolor y sufrimiento.

La formación de los esferoides requiere un entorno favorable para la agregación celular. Es por esta razón que el método más utilizado es el cultivo sobre superficies no adherentes, pero también es posible otorgar un recubrimiento de agarosa en la base de estas superficies. Este recubrimiento impide la adherencia de las células a la base de la placa y, por lo tanto, la formación de una monocapa y, además; debería conferir una superficie cóncava para favorecer la estructura esferoidal. Otro requisito para la formación de un esferoide es tener la capacidad de adhesión entre células de origen heterogéneo.

La formación de esferoides homogéneos depende de la cantidad de células requeridas para favorecer la agregación y adherencia intercelular. La capacidad de las células endoteliales, en particular HUVEC, y de fibroblastos de autoadherirse para formar estas estructuras tridimensionales es conocida (Heiss *et al.*, 2015) así como también la agregación para formar un esferoide de 2 componentes celulares, con el fin de usarlos como modelo para el estudio de procesos celulares, como la proliferación, migración y formación de microtubos (Wenger A *et al.*, 2006; Eckermann *et al.*, 2011). En nuestro estudio, encontramos que la mejor relación para cocultivar células endoteliales y fibroblastos fue de 1:4, que es la misma proporción reportada en otros estudios (Eckermann *et al.*, 2011). De acuerdo con estos reportes, una proporción 1:4 disminuye los focos necróticos y favorece la formación de microtubos. La imagen de la figura 11 B sugiere una densidad desigual en el esferoide, siendo mayor en el centro que en la periferia, lo que podría atribuirse bien a un efecto meramente visual o bien, a una orientación espacial establecida por parte de las diferentes células que componen el cocultivo. Wenger y colaboradores establecieron una ubicación céntrica de las células endoteliales (HUVEC), mediante tinción inmunohistoquímica con un anticuerpo específico anti CD31 demostrando un proceso de diferenciación temporal y espacial. Sin embargo, esta organización espacial de HUVEC y Fibroblastos humanos es distinta del patrón de organización de esferoides heterogéneos de HUVEC y células de músculo liso (SMC) el cual muestra una localización central de SMC y una ubicación periférica de HUVEC similar a un anillo (Wenger A *et al.*, 2006). Del mismo modo, difiere de la organización espacial del modelo esferoidal HUVEC/osteoblastos que da cuenta de una posición periférica de las células endoteliales en el esferoide (Wenger A *et al.*, 2004). Nuestra caracterización y reconstrucción tridimensional por microscopia confocal mostró una distribución aleatoria de las HMVEC y NHFC, lo que indica que pueden existir

diferencias específicas en la organización espacio temporal de los cocultivos según el tipo de célula, esto puede ser el resultado de procesos migratorios activos de las células, diferencias en la apoptosis o la tasa de proliferación de los diferentes tipos celulares (Frieboes *et al.*, 2006). No obstante, en nuestro trabajo no se puede atribuir tan certeramente la disposición observada a estas variables debido a que los procesos morfogénicos responsables de la diferenciación de un cocultivo esferoide heterogéneo no están estudiados en profundidad. Finalmente, la distribución celular aleatoria puede ser el resultado de la metodología empleada donde la centrifugación fuerza las interacciones celulares al azar.

Para permitir la reproducibilidad de los datos obtenidos, es necesaria una geometría bien definida, que a su vez depende del tamaño del esferoide, pues en estructuras muy grandes se produce necrosis en el centro del cultivo afectando el estado fisiológico de los esferoides. Además, el tiempo óptimo para lograr un esferoide “maduro” es importante. Esferoides muy jóvenes pueden no estar lo suficientemente empaquetados, o no haber expresado todo el patrón 3D en relación a la distribución de la matriz extracelular e interacciones célula-célula y célula-matriz, lo que puede producir cambios en la consistencia de la información obtenida. En este trabajo se obtuvieron, consistentemente, esferoides de aproximadamente 600  $\mu\text{m}$  de diámetro y de un volumen de  $0,076 \pm 0,003 \text{ mm}^3$ , que es consistente con el tamaño reportado en otros estudios (Eckermann *et al.*, 2011). Así, es posible suponer que el tamaño de los centros necróticos fue mínimo. En proyección, para confirmar este hecho, sería necesario hacer detección con un kit de fragmentación de ADN.

La apariencia discoide de superficie irregular de los esferoides obtenidos en este trabajo fue un hallazgo interesante. Si bien, las microfotografías presentadas en diversos estudios dan la impresión de que se forman esferas perfectas (Lorenzo *et al.*, 2011; Gualda E. *et al.*, 2014), otros trabajos con reconstrucciones 3D (Piccinini *et al.*, 2014) como la presentada en esta tesis, también reportan estas mismas formaciones discoides. Al carecer de un soporte rígido, es lógico entender que se formen pliegues en este tipo de construcciones artificiales, lo que explicaría la configuración de nuestros esferoides.

Los antecedentes de cocultivos esferoides, incluso de células de origen cardíaco no son muchos, pero, existen (Eckermann *et al.*, 2011; Wenger A *et al.*, 2006). No obstante, la incorporación de un tercer componente celular y de carácter parasitario no se registra en la literatura, al menos, para la combinación usada en el presente trabajo. Como se pudo apreciar en la figura 16, la infección se localizó en solo un aspecto del esferoide, ocupando aproximadamente sólo 1/8 del volumen total. La tinción previa con DAPI de los tripomastigotes de *T. cruzi* pudo no haber sido muy eficiente dejando parásitos sin teñir y por lo tanto dejando zonas de infección desapercibidas; o bien, que esta tinción pudo alterar de tal manera su biología, afectando la infectividad de los tripomastigotes o la capacidad replicativa de los amastigotes, impidiendo una visualización más extensa de la infección. Es más probable que la infección localizada en el esferoide se deba a la multiplicidad de infección usada, lo que disminuyó la probabilidad de que un mayor número de células fueran infectadas.

La construcción de los esferoides cardiacos presentados en esta tesis permite aproximarse a un modelo *in vitro* de cardiopatía chagásica crónica, donde se puede estudiar los efectos antiangiogénicos de *T. cruzi* en la vasculatura coronaria. Efectivamente, en la figura 17 A se puede apreciar que la formación de microtubos esta regionalmente disminuida, o casi ausente, en los esferoides infectados con *T. cruzi*. Este hallazgo es consistente con la infección focalizada previamente discutida. Este es un resultado esperable, por cuanto el efecto antiangiogénico de *T. cruzi* ya ha sido reportado previamente (Ferreira V. *et al.*, 2005). Esto es debido, a una relación hospedero-parásito con interacciones moleculares altamente específicas. En esta relación participa una importante gama de moléculas derivadas del huésped y del parásito. Una de esas moléculas es calreticulina, una proteína de unión a calcio presente en prácticamente cada célula de organismos superiores, la que se encuentra principalmente en el retículo endoplasmático interviniendo en varias funciones en especies de vertebrados e invertebrados. Estudios aseguran que en algunos parásitos, calreticulina participa en la modulación del sistema del complemento del hospedero (Ferreira V. *et al.*, 2004). Por otro lado, se le asocia propiedades *pleiotrópicas* en mecanismos antiangiogénicos en el hospedero (Ferreira *et al.*, 2005) asociados a su capacidad de inhibir la proliferación endotelial incluso en presencia de un estímulo por VEGF (Pike *et al.*, 1999) y a su efecto negativo sobre la unión de las células endoteliales a componentes de la matriz extracelular (Yao *et al.*, 2002). En este mismo contexto, Teixeira SC y colaboradores caracterizaron una proteína recombinante de *T. cruzi* llamada P21 (rP21) cuya aplicación a diferentes concentraciones en una línea celular endotelial de origen murino mostró una disminución en la formación de vasos sanguíneos después de 18 horas de incubación (Teixeira T. L. *et al.*, 2015). El efecto antiangiogénico de la proteína se produce mediante una interacción directa con las células endoteliales y no mediante una interacción con los componentes de la matriz extracelular (Teixeira S. C. *et al.*, 2017).

Se ha descrito que las estatinas a altas concentraciones ( $\mu\text{M}$ ) son antiangiogénicas mientras que a bajas concentraciones (nM) son proangiogénicas (Hazem F. *et al.* 2010). Los resultados de este trabajo, en el modelo 3D, se acercan a estos antecedentes, pues se pudo apreciar migración de células endoteliales y formación de microtubos a una concentración de 500 nM. Lo más importante de este resultado es que el efecto de simvastatina ocurrió en un contexto de infección con *T. cruzi*. Si bien la infección fue muy localizada, el efecto de simvastatina aparentemente es generalizado a todo el esferoide. Existe evidencia de la capacidad de las estatinas de modular la angiogénesis mediante el control de la síntesis de VEGF, por ejemplo lovastatina a concentraciones micromolares es capaz de inhibir la producción de VEGF en fibroblastos transformados (Eleszko *et al.*, 1999). En contraste, a concentración nanomolar las estatinas desarrollan angiogénesis vía Akt kinasa en HUVEC (Kureishi *et al.*, 2000); sin embargo, esto varía dependiendo del tipo celular y el modelo de cultivo. Es así como simvastatina a concentraciones de 1-3  $\mu\text{M}$  estimula la síntesis de VEGF mientras que concentraciones muy bajas (10-100 nM) no influencia significativamente en el proceso en HUVEC.

Por el contrario, a concentración de 100 nM mejora la migración de células endoteliales y la formación de microtubos en un modelo 2D, perdiéndose el efecto a concentraciones de 1-10 uM (Frick et al., 2003). En todo caso, el efecto de la participación de VEGF, de la vía de Akt kinasa o la formación de contactos celulares heterotípicos (Wenger A *et al.*, 2006) en la migración y formación de microtubos en nuestro modelo, debe ser confirmada en estudios ulteriores.

## 7. CONCLUSION

La construcción de esferoides en cocultivo de células endoteliales y fibroblastos de origen cardíaco es posible, así como también la infección con *Trypanosoma cruzi* sin afectar la viabilidad del cocultivo. Este esferoide constituye un modelo de estudio de la interacción del parásito con sistemas multicelulares *in vitro*. Específicamente, *T. cruzi* inhibe la formación de microtubos en el modelo esferoidal, efecto que puede ser revertido por la administración de simvastatina a concentraciones dentro del rango nanomolar (500 nM), lo que implica que la hipótesis de la tesis se comprueba.

Esto podría generar una modulación de la respuesta del hospedero frente al parásito, al menos, en uno de los cuatro procesos importantes que fundamentan la patogénesis de la enfermedad de Chagas, a saber, las alteraciones microvasculares. Contribuyendo así a la disminución de la progresión de la enfermedad.

## 8. BIBLIOGRAFÍA

- Andrade, D., Serra, R., Svensjö, E., Lima, A. P. C., Ramos Junior, E. S., Fortes, F. S., ... Scharfstein, J. (2012). Trypanosoma cruzi invades host cells through the activation of endothelin and bradykinin receptors: A converging pathway leading to chagasic vasculopathy. *British Journal of Pharmacology*, 165(5), 1333–1347. <https://doi.org/10.1111/j.1476-5381.2011.01609.x>
- Apt, W. (2010). Current and developing therapeutic agents in the treatment of Chagas disease. *Drug Design, Development and Therapy*, 4, 243–253. <https://doi.org/10.2147/DDDT.S8338>
- Araujo, P. F., Almeida, A. B., Pimentel, C. F., da Silva, A. R., Sousa, A., Valente, S. A., ... Teixeira, A. R. L. (2017). Sexual transmission of american trypanosomiasis in humans: A new potential pandemic route for chagas parasites. *Memorias Do Instituto Oswaldo Cruz*, 112(6), 437–446. <https://doi.org/10.1590/0074-02760160538>
- Ashton, A. W., Mukherjee, S., Nagajyothi, F., Huang, H., Braunstein, V. L., Desruisseaux, M. S., ... Tanowitz, H. B. (2007). Thromboxane A<sub>2</sub> is a key regulator of pathogenesis during *Trypanosoma cruzi* infection. *The Journal of Experimental Medicine*, 204(4), 929–940. <https://doi.org/10.1084/jem.20062432>
- Baker, B. M., & Chen, C. S. (2012). Deconstructing the third dimension – how 3D culture microenvironments alter cellular cues. *Journal of Cell Science*, 125(13), 3015–3024. <https://doi.org/10.1242/jcs.079509>
- Barbone, D., Yang, T. M., Morgan, J. R., Gaudino, G., & Broaddus, V. C. (2008). Mammalian target of rapamycin contributes to the acquired apoptotic resistance of human mesothelioma multicellular spheroids. *Journal of Biological Chemistry*, 283(19), 13021–13030. <https://doi.org/10.1074/jbc.M709698200>
- Baumhueter, S., Dybdal, N., Kyle, C., & Lasky, L. A. (1994). Global vascular expression of murine CD34, a sialomucin-like endothelial ligand for L-selectin. *Blood*, 84(8), 2554–2565.
- Bern, C. (2011). Antitrypanosomal therapy for chronic Chagas' disease. *N Eng J Med*, 364(26), 2527–2534. <https://doi.org/10.1056/NEJMct1014204>
- Bern, C. (2015). Chagas' Disease. *New England Journal of Medicine*, 373(5), 456–466. <https://doi.org/10.1056/NEJMra1410150>
- Bern, C., Montgomery, S. P., Herwaldt, B. L., Rassi, A., Marin-Neto, J. A., Dantas, R. O., ... Moore, A. C. (2007). Evaluation and treatment of chagas disease in the United States: a systematic review. *Jama*, 298(18), 2171–2181. <https://doi.org/10.1001/jama.298.18.2171>
- Calavaro., C. G., Collao, E. H., Pezzi, F. F., Riquelme, M. C., Garcés, A. P., Brevis, C. P., ... Hidalgo, M. T. (2014). *Norma General Técnica Control Y Prevención Nacional De La enfermedad de chagas*. MINSAL.
- Campos-Estrada, C., Liempi, A., González-Herrera, F., Lapier, M., Kemmerling, U., Pesce, B., ... Maya, J. D. (2015). Simvastatin and Benznidazole-Mediated Prevention of Trypanosoma cruzi-Induced Endothelial Activation: Role of 15-epi-lipoxin A4 in the Action of Simvastatin. *PLoS Neglected Tropical Diseases*, 9(5),

- 1–20. <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0003770>
- Carmeliet, P. (2003). Angiogenesis in health and disease. *Nature Medicine*, 9(6), 653–660. <https://doi.org/10.1038/nm0603-653>
- Carod-Artal, F. J., & Gascon, J. (2010). Chagas disease and stroke. *The Lancet Neurology*, 9(5), 533–542. [https://doi.org/10.1016/S1474-4422\(10\)70042-9](https://doi.org/10.1016/S1474-4422(10)70042-9)
- Chang, H. Y., Chi, J.-T., Dudoit, S., Bondre, C., van de Rijn, M., Botstein, D., & Brown, P. O. (2002). Diversity, topographic differentiation, and positional memory in human fibroblasts. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 99(20), 12877–12882. <https://doi.org/10.1073/pnas.162488599>
- Coura, J. R., & Borges-Pereira, J. (2010). Chagas disease: 100 years after its discovery. A systemic review. *Acta Tropica*, 115(1–2), 5–13. <https://doi.org/10.1016/j.actatropica.2010.03.008>
- Cukierman, E., Pankov, R., Stevens, D. R., & Yamada, K. M. (2001). Taking Cell-Matrix Adhesions to the Third Dimension. *Science*, 294(5547), 319–342. <https://doi.org/10.1126/science.1064829>
- Dias, J. C. P. (1989). The indeterminate form of human chronic Chagas' disease: a clinical epidemiological review. *Revista Da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*, 22(3), 147–156. <https://doi.org/10.1590/S0037-86821989000300007>
- Dimmeler, S., Dernbach, E., & Zeiher, A. M. (2000). Phosphorylation of the endothelial nitric oxide synthase at Ser 1177 is required for VEGF-induced endothelial cell migration. *FEBS Lett*, 477, 258–262.
- Diniz, L. de F., Urbina, J. A., de Andrade, I. M., Mazzeti, A. L., Martins, T. A. F., Caldas, I. S., ... Bahia, M. T. (2013). Benznidazole and Posaconazole in Experimental Chagas Disease: Positive Interaction in Concomitant and Sequential Treatments. *PLoS Neglected Tropical Diseases*, 7(8), e2367. <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0002367>
- Eckermann, C. W., Lehle, K., Schmid, S. A., Wheatley, D. N., & Kunz-Schughart, L. A. (2011). Characterization and modulation of fibroblast/endothelial cell co-cultures for the *in vitro* preformation of three-dimensional tubular networks. *Cell Biology International*, 35(11), 1097–1110. <https://doi.org/10.1042/CBI20100718>
- Eleszko, W. F., Ałkowiec, E. Z. B., Ieberth, E. S., Arczak, M. M., Abrowska, A. D., & Iermasz, A. G. (1999). Lovastatin and tumor necrosis factor exhibit potentiated antitumor effects against Ha-ras-transformed murine tumor via inhibition of tumor-induced angiogenesis. *Int J Cancer*, 567(June 1998), 560–567.
- Elewa, H. F., Kozak, A., El-remessy, A. B., Frye, R. F., Johnson, M. H., Ergul, A., & Fagan, S. C. (2009). Early Atorvastatin Reduces Hemorrhage after Acute Cerebral Ischemia in Diabetic Rats, 330(2), 532–540. <https://doi.org/10.1124/jpet.108.146951.outcomes>
- Endres, M. (2005). Statins and stroke, 1093–1110. <https://doi.org/10.1038/sj.jcbfm.9600116>
- Eriksson, M., Taskinen, M., & Leppä, S. (2006). Mitogen Activated Protein Kinase-Dependent Activation of c-Jun and c-Fos is required for Neuronal differentiation but not for Growth and Stress Repose in PC12 cells. *Journal of Cellular Physiology*, 207(1), 12–22. <https://doi.org/10.1002/JCP>

- Ferreira, V., Molina, M. C., Schwaeble, W., Lemus, D., & Ferreira, A. (2005). Does *Trypanosoma cruzi* calreticulin modulate the complement system and angiogenesis? *Trends in Parasitology*, 21(4), 169–174. <https://doi.org/10.1016/j.pt.2005.02.005>
- Ferreira, V., Valck, C., Sanchez, G., Gingras, A., Tzima, S., Molina, M. C., ... Ferreira, A. (2004). The Classical Activation Pathway of the Human Complement System Is Specifically Inhibited by Calreticulin from *Trypanosoma cruzi*. *The Journal of Immunology*, 172(5), 3042–3050. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.172.5.3042>
- Freire-De-Lima, C. G., Nascimento, D. O., Soares, M. B. P., Bozza, P. T., Castro-Faria-Neto, H. C., De Mello, F. G., ... Lopes, M. F. (2000). Uptake of apoptotic cells drives the growth of a pathogenic trypanosome in macrophages. *Nature*, 403(6766), 199–203. <https://doi.org/10.1038/35003208>
- Frick, M., Dulak, J., Cisowski, J., Józkwicz, A., Zwick, R., Alber, H., ... Weidinger, F. (2003). Statins differentially regulate vascular endothelial growth factor synthesis in endothelial and vascular smooth muscle cells. *Atherosclerosis*, 170(2), 229–236. [https://doi.org/10.1016/S0021-9150\(03\)00299-5](https://doi.org/10.1016/S0021-9150(03)00299-5)
- Frieboes, H. B., Zheng, X., Sun, C. H., Tromberg, B., Gatenby, R., & Cristini, V. (2006). An integrated computational/experimental model of tumor invasion. *Cancer Research*, 66(3), 1597–1604. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-05-3166>
- Gähwiler, BH. (1999). Nerve cells in culture: the extraordinary discovery by Ross Granville Harrison. *Brain Res Bull* 50(5-6):343-4.
- Griffith, C. K., Miller, C., Sainson, R. C. A., Calvert, J. W., Jeon, N. L., Hughes, C. C. W., & George, S. C. (2005). Diffusion Limits of an in Vitro Thick Prevascularized Tissue. *Tissue Engineering*, 11(1–2), 257–266. <https://doi.org/10.1089/ten.2005.11.257>
- Gualda, E. J., Simões, D., Pinto, C., Alves, P. M., & Brito, C. (2014). Imaging of human differentiated 3D neural aggregates using light sheet fluorescence microscopy. *Frontiers in Cellular Neuroscience*, 8(August), 1–10. <https://doi.org/10.3389/fncel.2014.00221>
- Guedes, P. M. da M., Urbina, J. A., de Lana, M., Afonso, L. C. C., Veloso, V. M., Tafuri, W. L., ... Bahia, M. T. (2004). Activity of the new triazole derivative albaconazole against *Trypanosoma* (Schizotrypanum) *cruzi* in dog hosts. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 48(11), 4286–4292. <https://doi.org/10.1128/AAC.48.11.4286-4292.2004>
- Hall, B. S., Bot, C., & Wilkinson, S. R. (2011). Nifurtimox activation by trypanosomal type I nitroreductases generates cytotoxic nitrile metabolites. *Journal of Biological Chemistry*, 286(15), 13088–13095. <https://doi.org/10.1074/jbc.M111.230847>
- Hall, B. S., & Wilkinson, S. R. (2012). Activation of benznidazole by trypanosomal type I nitroreductases results in glyoxal formation. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 56(1), 115–123. <https://doi.org/10.1128/AAC.05135-11>
- Hazem, F., Azza, B., Payaningal R., & Susan C. (2010) Diverse Effects of Statins on Angiogenesis: New Therapeutic Avenues. *Pharmacotherapy*. Feb; 30(2):169-76.
- Heiss, M., Hellström, M., Kalén, M., May, T., Weber, H., Hecker, M., ... Korff, T. (2015). Endothelial cell spheroids as a versatile tool to study angiogenesis in vitro. *FASEB Journal*, 29(7), 3076–3084. <https://doi.org/10.1096/fj.14-267633>

- Herwaldt, B. L. (2001). Laboratory-acquired parasitic infections from accidental exposures. *Clinical Microbiology Reviews*, *14*(4), 659–688. <https://doi.org/10.1128/CMR.14.3.659-688.2001>
- Hindler, K., Cleeland, C. S., Rivera, E., & Collard, C. D. (2006). The role of statins in cancer therapy. *The Oncologist*, *11*, 306–315. <https://doi.org/10.1634/theoncologist.11-3-306>
- Hu, Z., Zhang, F., Yang, Z., Yang, N., Zhang, D., Zhang, J., & Cao, K. (2008). Combination of simvastatin administration and EPC transplantation enhances angiogenesis and protects against apoptosis for hindlimb ischemia. *Journal of Biomedical Science*, *15*(4), 509–517. <https://doi.org/10.1007/s11373-008-9243-1>
- Huang, H., Petkova, S. B., Cohen, A. W., Bouzahzah, B., Chan, J., Zhou, J., ... Tanowitz, H. B. (2003). Activation of transcription factors AP-1 and NF-kappa B in murine Chagasic myocarditis. *Infection and Immunity*, *71*(5), 2859–2867. <https://doi.org/10.1128/IAI.71.5.2859>
- Jackson, Y., Alirol, E., Getaz, L., Wolff, H., Combescure, C., & Chappuis, F. (2010). Tolerance and safety of nifurtimox in patients with chronic chagas disease. *Clinical Infectious Diseases: An Official Publication of the Infectious Diseases Society of America*, *51*(10), e69-75. <https://doi.org/10.1086/656917>
- Katsumoto, M., Shingu, T., Kuwashima, R., Nakata, A., Nomura, S., & Chayama, K. (2005). Biphasic Effect of HMG-CoA Reductase Inhibitor, Pitavastatin, on Vascular Endothelial Cells and Angiogenesis. *Circ J*, *69*(12), 1547–1555.
- Kellouche, S., Mourah, S., Bonnefoy, A., Schoëvaert, D., Podgorniak, M. P., Calvo, F., ... Dosquet, C. (2007). Platelets, thrombospondin-1 and human dermal fibroblasts cooperate for stimulation of endothelial cell tubulogenesis through VEGF and PAI-1 regulation. *Experimental Cell Research*, *313*(3), 486–499. <https://doi.org/10.1016/j.yexcr.2006.10.023>
- Khetan, S., Guvendiren, M., Legant, W. R., Cohen, D. M., Christopher, S., & Burdick, J. A. (2013). Degradation-mediated cellular traction directs stem cell fate in covalently crosslinked three-dimensional hydrogels. *Nat Mater*, *12*(5), 458–465. <https://doi.org/10.1038/nmat3586>. Degradation-mediated
- Korff, T., & Augustin, H. G. (1998). Integration of endothelial cells in multicellular spheroids prevents apoptosis and induces differentiation. - PubMed - NCBI. *The Journal of Cell Biology*, *143*(5), 1341–1352. <https://doi.org/10.1083/jcb.143.5.1341>
- Korff, T., Kimmina, S., Martiny-Baron, G., & Augustin, H. G. (2001). Blood vessel maturation in a 3-dimensional spheroidal coculture model: direct contact with smooth muscle cells regulates endothelial cell quiescence and abrogates VEGF responsiveness. *The FASEB Journal: Official Publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology*, *15*(2), 447–457. <https://doi.org/10.1096/fj.00-0139com>
- Koyuturk, M., Ersoz, M., & Altıok, N. (2004). Simvastatin induces proliferation inhibition and apoptosis in C6 glioma cells via c-jun N-terminal kinase, *370*, 212–217. <https://doi.org/10.1016/j.neulet.2004.08.020>
- Kunz-Schughart, L. A., Schroeder, J. A., Wondrak, M., van Rey, F., Lehle, K., Hofstaedter, F., & Wheatley, D. N. (2006). Potential of fibroblasts to regulate the formation of three-dimensional vessel-like structures from endothelial cells in vitro. *American Journal of Physiology-Cell Physiology*, *290*(5), C1385–C1398.

<https://doi.org/10.1152/ajpcell.00248.2005>

- Kureishi, Y., Luo, Z., Shiojima, I., Bialik, A., Fulton, D., Lefer, D. J., ... Walsh, K. (2000). The HMG-CoA reductase inhibitor simvastatin activates the protein kinase Akt and promotes angiogenesis in normocholesterolemic animals. *Nature Medicine*, *6*(9), 1004–1010. <https://doi.org/10.1038/79510>
- Lo, C. M., Wang, H. B., Dembo, M., & Wang, Y. L. (2000). Cell movement is guided by the rigidity of the substrate. *Biophysical Journal*, *79*(1), 144–152. [https://doi.org/10.1016/S0006-3495\(00\)76279-5](https://doi.org/10.1016/S0006-3495(00)76279-5)
- Lorenzo, C., Frongia, C., Jorand, R., Fehrenbach, J., Weiss, P., Maandhui, A., ... Lobjois, V. (2011). SPIM imaging of live cell division dynamics in 3D in large spheroid tumor models. *Molecular Biology of the Cell*, *22*, 1–8.
- Machado, F. S., Dutra, W. O., Esper, L., Gollob, K. J., Teixeira, M. M., Factor, S. M., ... Garg, N. J. (2012). Current understanding of immunity to *Trypanosoma cruzi* infection and pathogenesis of Chagas disease. *Seminars in Immunopathology*, *34*(6), 753–770. <https://doi.org/10.1007/s00281-012-0351-7>
- Mitelman, J. E. (Argentinian S. of C. (2011). Consensus Statement on Chagas-Mazza Disease. *Argentine Journal of Cardiology*, *79*, 544–564. Retrieved from <http://bases.bireme.br/cgi-bin/wxislind.exe/iah/online/?IsisScript=iah/iah.xis&src=google&base=LILACS&lang=p&nextAction=lnk&exprSearch=639690&indexSearch=ID>
- Molina-Berríos, A., Campos-Estrada, C., Henriquez, N., Faúndez, M., Torres, G., Castillo, C., ... Maya, J. D. (2013). Protective Role of Acetylsalicylic Acid in Experimental *Trypanosoma cruzi* Infection: Evidence of a 15-epi-Lipoxin A4-Mediated Effect. *PLoS Neglected Tropical Diseases*, *7*(4). <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0002173>
- Molina-Berríos, A., Campos-Estrada, C., Lapier, M., Duaso, J., Kemmerling, U., Galanti, N., ... Maya, J. D. (2013). Benznidazole prevents endothelial damage in an experimental model of Chagas disease. *Acta Tropica*, *127*(1), 6–13. <https://doi.org/10.1016/j.actatropica.2013.03.006>
- Molina, J., Martins-Filho, O., Brener, Z., Romanha, A. J., Loebenberg, D., & Urbina, J. A. (2000). Activities of the triazole derivative SCH 56592 (posaconazole) against drug-resistant strains of the protozoan parasite *Trypanosoma* (*Schizotrypanum*) *cruzi* in immunocompetent and immunosuppressed murine hosts. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, *44*(1), 150–155. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10602737>
- Montesano, R., Pepper, M. S., & Orci, L. (1993). Paracrine induction of angiogenesis in vitro by Swiss 3T3 fibroblasts. *Journal of Cell Science*, *105* ( Pt 4), 1013–1024.
- Nakatsu, M. N., Sainson, R. C. A., Aoto, J. N., Taylor, K. L., Aitkenhead, M., Pérez-del-Pulgar, S., ... Hughes, C. C. W. (2003). Angiogenic sprouting and capillary lumen formation modeled by human umbilical vein endothelial cells (HUVEC) in fibrin gels: The role of fibroblasts and Angiopoietin-1. *Microvascular Research*, *66*(2), 102–112. [https://doi.org/10.1016/S0026-2862\(03\)00045-1](https://doi.org/10.1016/S0026-2862(03)00045-1)
- Newman, A. C., Nakatsu, M. N., Chou, W., Gershon, P. D., & Hughes, C. C. W. (2011). The requirement for fibroblasts in angiogenesis: fibroblast-derived matrix proteins are essential for endothelial cell lumen formation. *Molecular Biology of the Cell*, *22*(20), 3791–3800. <https://doi.org/10.1091/mbc.E11-05-0393>

- Nunes, M. C. P., Barbosa, M. M., Ribeiro, A. L. P., Colosimo, E. A., & Rocha, M. O. C. (2009). Left Atrial Volume Provides Independent Prognostic Value in Patients With Chagas Cardiomyopathy. *Journal of the American Society of Echocardiography*, *22*(1), 82–88. <https://doi.org/10.1016/j.echo.2008.11.015>
- Nunes, M. C. P., Reis, R. C. P., Colosimo, E. A., Ribeiro, A. L. P., Barbosa, F. B. L., Da Silva, J. L. P., ... Rocha, M. O. C. (2011). Risk estimation approach in Chagas disease is still needed. *International Journal of Cardiology*, *147*(2), 294–296. <https://doi.org/10.1016/j.ijcard.2010.12.044>
- Paunescu, V., Bojin, F. M., Tatu, C. A., Gavriliuc, O. I., Rosca, A., Gruia, A. T., ... Vermesan, S. (2011). Tumour-associated fibroblasts and mesenchymal stem cells: More similarities than differences. *Journal of Cellular and Molecular Medicine*, *15*(3), 635–646. <https://doi.org/10.1111/j.1582-4934.2010.01044.x>
- Pecoul, B., Batista, C., Stobbaerts, E., Ribeiro, I., Vilasanjuan, R., Gascon, J., ... Hotez, P. J. (2016). The BENEFIT Trial: Where Do We Go from Here? *PLoS Neglected Tropical Diseases*, *10*(2), 2–5. <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0004343>
- Pereira Nunes, M. D. C., De Melo Barbosa, M., Andrade Brum, V. A., & Da Costa Rocha, M. O. (2004). Morphofunctional characteristics of the right ventricle in Chagas' dilated cardiomyopathy. *International Journal of Cardiology*, *94*(1), 79–85. <https://doi.org/10.1016/j.ijcard.2003.05.003>
- Pike, S. E., Yao, L., Setsuda, J., Jones, K. D., Cherney, B., Appella, E., ... Tosato, G. (1999). Calreticulin and calreticulin fragments are endothelial cell inhibitors that suppress tumor growth. *Blood*, *94*(7), 2461–2468.
- Prata, A. (2001). Clinical and epidemiological aspects of Chagas disease. *The Lancet. Infectious Diseases*, *1*(2), 92–100. [https://doi.org/10.1016/S1473-3099\(01\)00065-2](https://doi.org/10.1016/S1473-3099(01)00065-2)
- Radicals, F. (2018). *The Journal of The American Society of Hematology*, *76*(4), 655–663.
- Rajendran, P., Rengarajan, T., Thangavel, J., Nishigaki, Y., Sakthisekaran, D., Sethi, G., & Nishigaki, I. (2013). The vascular endothelium and human diseases. *International Journal of Biological Sciences*, *9*(10), 1057–1069. <https://doi.org/10.7150/ijbs.7502>
- Rassi, A., Little, W. C., Rassi, A. G., Rassi, G. G., Hasslocher-moreno, A., & Sousa, A. S. (2006). Development and Validation of a Risk Score for Predicting Death in Chagas' Heart Disease. *October*, 799–808.
- Rassi, A., Rassi, A., & Marcondes de Rezende, J. (2012). American Trypanosomiasis (Chagas Disease). *Infectious Disease Clinics of North America*, *26*(2), 275–291. <https://doi.org/10.1016/j.idc.2012.03.002>
- Rassi, A., Rassi, A., & Marin-Neto, J. A. (2010). Chagas disease. *The Lancet*, *375*(9723), 1388–1402. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(10\)60061-X](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(10)60061-X)
- Rassi, A., Rassi, A., & Rassi, S. G. (2007). Predictors of mortality in chronic Chagas disease: A systematic review of observational studies. *Circulation*, *115*(9), 1101–1108. <https://doi.org/10.1161/CIRCULATIONAHA.106.627265>
- Requena-Méndez, A., Aldasoro, E., de Lazzari, E., Sicuri, E., Brown, M., Moore, D. A. J., ... Muñoz, J. (2015). Prevalence of Chagas Disease in Latin-American

- Migrants Living in Europe: A Systematic Review and Meta-analysis. *PLoS Neglected Tropical Diseases*, 9(2), 1–15.  
<https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0003540>
- Ribeiro, A. L., Nunes, M. P., Teixeira, M. M., & Rocha, M. O. C. (2012). Diagnosis and management of Chagas disease and cardiomyopathy. *Nature Reviews Cardiology*, 9(10), 576–589. <https://doi.org/10.1038/nrcardio.2012.109>
- Rocha, M. O. C., Nunes, M. C. P., & Ribeiro, A. L. (2009). Morbidity and prognostic factors in chronic chagasic cardiopathy. *Memorias Do Instituto Oswaldo Cruz*, 104(SUPPL. 1), 159–166. <https://doi.org/10.1590/S0074-02762009000900022>
- Rossi, M. A., Tanowitz, H. B., Malvestio, L. M., Celes, M. R., Campos, E. C., Blefari, V., & Prado, C. M. (2010). Coronary microvascular disease in chronic chagas cardiomyopathy including an overview on history, pathology, and other proposed pathogenic mechanisms. *PLoS Neglected Tropical Diseases*, 4(8).  
<https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0000674>
- Sanyal, S. (2014). Culture and Assay Systems Used for 3D Cell Culture. *Corning*.  
 tomado de  
[https://www.corning.com/media/worldwide/cls/documents/an\\_245\\_culture\\_and\\_assay\\_systems\\_used\\_for\\_3D\\_cell\\_culture.pdf](https://www.corning.com/media/worldwide/cls/documents/an_245_culture_and_assay_systems_used_for_3D_cell_culture.pdf)
- Sathler-Avelar, R., Vitelli-Avelar, D. M., Teixeira-Carvalho, A., & Martins-Filho, O. A. (2009). Innate immunity and regulatory T-cells in human Chagas disease: What must be understood? *Memorias Do Instituto Oswaldo Cruz*, 104(SUPPL. 1), 246–251. <https://doi.org/10.1590/S0074-02762009000900031>
- Shikanai-yasuda, M. A., & Carvalho, N. B. (2012). Oral Transmission of Chagas Disease, 54, 845–852. <https://doi.org/10.1093/cid/cir956>
- Shiu, Y. T., Li, S., Marganski, W. A., Usami, S., Schwartz, M. A., Wang, Y. L., ... Chien, S. (2004). Rho Mediates the Shear-Enhancement of Endothelial Cell Migration and Traction Force Generation. *Biophysical Journal*, 86(4), 2558–2565.  
[https://doi.org/10.1016/S0006-3495\(04\)74311-8](https://doi.org/10.1016/S0006-3495(04)74311-8)
- Teixeira, S. C., Lopes, D. S., Gimenes, S. N. C., Teixeira, T. L., Da Silva, M. S., Brígido, R. T. E. S., ... Da Silva, C. V. (2017). Mechanistic Insights into the Anti-angiogenic Activity of Trypanosoma cruzi Protein 21 and its Potential Impact on the Onset of Chagasic Cardiomyopathy. *Scientific Reports*, 7(February), 1–14.  
<https://doi.org/10.1038/srep44978>
- Teixeira, T. L., Machado, F. C., Alves Da Silva, A., Teixeira, S. C., Borges, B. C., Dos Santos, M. A., ... Da Silva, C. V. (2015). Trypanosoma cruzi P21: A potential novel target for chagasic cardiomyopathy therapy. *Scientific Reports*, 5, 1–10.  
<https://doi.org/10.1038/srep16877>
- Thornalley, P. J. (2008). Protein and nucleotide damage by glyoxal and methylglyoxal in physiological systems--role in ageing and disease. *Drug Metabolism and Drug Interactions*, 23(1–2), 125–150. <https://doi.org/10.1515/DMDI.2008.23.1-2.125>
- Toledo, M. J. de O., Bahia, M. T., Carneiro, C. M., Martins-Filho, O. A., Tibayrenc, M., Barnabé, C., ... de Lana, M. (2003). Chemotherapy with benznidazole and itraconazole for mice infected with different Trypanosoma cruzi clonal genotypes. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 47(1), 223–230. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12499195>

- Urbich, C., Dernbach, E., Zeiher, A. M., & Dimmeler, S. (2002). Double-edged role of statins in angiogenesis signaling. *Circulation Research*, 90(6), 737–744. <https://doi.org/10.1161/01.RES.0000014081.30867.F8>
- Urbina, J. A. (2009). Ergosterol biosynthesis and drug development for Chagas disease. *Memorias Do Instituto Oswaldo Cruz*, 104 Suppl 1, 311–318. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19753490>
- Urbina, J. A., Lazard, K., Larralde, G., Aguirre, T., Piras, M. M., & Piras, R. (1988). Synergistic effects of ketoconazole and SF-86327 on the proliferation of epimastigotes and amastigotes of *Trypanosoma (Schizotrypanum) cruzi*. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 544, 357–358. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/3063176>
- Urbina, J. A., Payares, G., Sanoja, C., Lira, R., & Romanha, A. J. (2003). In vitro and in vivo activities of ravuconazole on *Trypanosoma cruzi*, the causative agent of Chagas disease. *International Journal of Antimicrobial Agents*, 21(1), 27–38. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12507835>
- Videm, V., & Albrigtsen, M. (2008). Soluble ICAM-1 and VCAM-1 as markers of endothelial activation. *Scandinavian Journal of Immunology*, 67(5), 523–531. <https://doi.org/10.1111/j.1365-3083.2008.02029.x>
- Wenger, A., Kowalewski, N., Stahl, A., Mehlhorn, A. T., Schmal, H., Stark, G. B., & Finkenzeller, G. (2006). Development and characterization of a spheroidal coculture model of endothelial cells and fibroblasts for improving angiogenesis in tissue engineering. *Cells Tissues Organs*, 181(2), 80–88. <https://doi.org/10.1159/000091097>
- Wenger, A., Stahl, A., Weber, H., Finkenzeller, G., & Augustin, H. G. (2004). Modulation of, 10(9), 1536–1547.
- Whitmore, G. F., & Varghese, A. J. (1986). The biological properties of reduced nitroheterocyclics and possible underlying biochemical mechanisms. *Biochemical Pharmacology*, 35(1), 97–103. [https://doi.org/10.1016/0006-2952\(86\)90565-4](https://doi.org/10.1016/0006-2952(86)90565-4)
- WHO. (2010). Chagas disease : control and elimination. *Sixty-Third World Health Assembly*, (April), 4.
- World Health Organization. (2015). Chagas disease in Latin America: an epidemiological update based on 2010 estimates. *Weekly Epidemiological Record*, (6), 33–44. <https://doi.org/10.2147/IBPC.S70402>
- Yamada, K. M., & Cukierman, E. (2007). Modeling Tissue Morphogenesis and Cancer in 3D. *Cell*, 130(4), 601–610. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2007.08.006>
- Yao, L., Pike, S. E., & Tosato, G. (2002). Laminin binding to the calreticulin fragment vasostatin regulates endothelial cell function. *Journal of Leukocyte Biology*, 71(1), 47–53. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11781379>
- Zhang, L., Zhang, Z. G., Liu, X. S., Hozeska-solgot, A., & Chopp, M. (2007). The PI3K / Akt Pathway Mediates the Neuroprotective Effect of Atorvastatin in Extending Thrombolytic Therapy After Embolic Stroke in the Rat. <https://doi.org/10.1161/ATVBAHA.107.150748>
- Zuppinger, C. (2016). 3D culture for cardiac cells. *Biochimica et Biophysica Acta - Molecular Cell Research*, 1863(7), 1873–1881. <https://doi.org/10.1016/j.bbamcr.2015.11.036>