



UNIVERSIDAD PERUANA
CAYETANO HEREDIA

FACULTAD DE CIENCIAS E INGENIERÍA

EVALUACIÓN EN LA EXPRESIÓN DE BIOMARCADORES PREDICTIVOS
ASOCIADOS A LA VÍA DE TGF- β PARA CARDIOMIOPATÍA CHAGÁSICA
CRÓNICA EN *CAVIA PORCELLUS*

TRABAJO DE INVESTIGACIÓN PARA OPTAR EL GRADO DE
BACHILLER EN CIENCIAS CON MENCIÓN EN BIOLOGÍA

AUTORES:

MARIA ALEJANDRA PEREZ PACHAS

ANA CLAUDIA ROSALES TALLEDO

ASESOR:

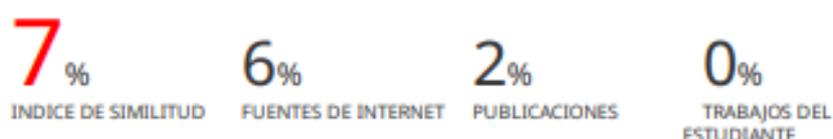
DRA. MANUELA RENEE VERASTEGUI PIMENTEL

LIMA-PERÚ

2024

EVALUACIÓN EN LA EXPRESIÓN DE BIOMARCADORES PREDICTIVOS ASOCIADOS A LA VÍA DE TGF- β PARA CARDIOMIOPATÍA CHAGÁSICA CRÓNICA EN CAVIA PORCELLUS

INFORME DE ORIGINALIDAD



FUENTES PRIMARIAS

1	hdl.handle.net Fuente de Internet	1%
2	repositorio.uam.es Fuente de Internet	1%
3	agris.fao.org Fuente de Internet	<1%
4	Germán Ramírez-Olivencia, Marta Arsuaga, Diego Torrús, Moncef Belhassen-Garcia et al. "Prevalence of digestive disorders associated with imported Chagas disease (PADChI study): an observational study", Revista Clínica Española (English Edition), 2023 Publicación	<1%
5	Luisa E. Delgado, Víctor H. Marín. "Interannual Changes in the Habitat Area of the Black-Necked Swan, <i>Cygnus melancoryphus</i> , in the Carlos Anwandter	<1%

TABLA DE CONTENIDOS

Resumen.....	1
Abstract.....	2
Estado del arte.....	3
1. Generalidades de la enfermedad de Chagas.....	3
1.1. Desarrollo de la enfermedad, cuadro clínico y tratamiento.....	3
1.2. Modelos animales.....	4
2. Cardiomiopatía Chagásica crónica.....	6
2.1. Alteraciones morfológicas.....	6
2.2. Alteraciones moleculares.....	7
3. Vía de TGF- β	8
3.1. Funciones en el humano.....	8
3.2. Vías.....	8
3.2.1. Vía canónica.....	8
3.2.2. Vía no canónica.....	9
3.3. Biomarcadores asociados a la vía de TGF- β	9
Problema de investigación.....	10
Estrategia de abordaje.....	13
Referencias bibliográficas.....	15

Resumen

La enfermedad de Chagas(EC) es causada por *Trypanosoma cruzi* y presenta la fase aguda que puede avanzar hacia fase indeterminada y crónica. Si el individuo infectado no recibe tratamiento durante las dos primeras fases, entre el 20% a 40% desarrollarán la fase crónica. El tratamiento es eficiente solo para la fase aguda. Específicamente al desarrollar cardiomiopatía chagásica crónica(CCC), causante de la mayor morbilidad en la EC, no existe droga que revierta el daño causado por el parásito a nivel del miocardio. Estudios recientes han asociado la vía de señales inducida por TGF- β en la progresión de la EC. Sin embargo, aún no se conoce la variación en la expresión de biomarcadores proteicos involucrados a lo largo de esta vía que estén asociados con la progresión hacia CCC y sirvan como predictores de esta. Para llenar este vacío, se utilizarán los biomarcadores asociados a la vía TGF- β : LOXL2, CTGF, AngII, y P38MAPK. La sobreexpresión de estos biomarcadores amplifica la activación de los fibroblastos cardiacos del miocardio en respuesta a la infección, siendo cruciales para el desarrollo de CCC. Nos preguntamos cómo varían los niveles de abundancia relativa de estos biomarcadores a lo largo de la EC. Hipotetizamos que el cambio en la expresión desde la fase aguda hasta el desarrollo de CCC de por lo menos una de las moléculas, permitirá usarla como potencial biomarcador predictor específico para CCC. Para ello, se usará a *Cavia porcellus*, modelo animal que desarrolla la EC de manera similar al humano, haciendo posible analizar los biomarcadores a nivel de tejido cardíaco y suero a diferentes tiempos post infección. Esto se hará con la finalidad de que en el futuro se puedan usar como biomarcadores predictores de riesgo de progresión a CCC en humanos.

Palabras claves: *Trypanosoma cruzi*, *Cavia porcellus*, factor de crecimiento transformante β , Cardiomiopatía chagásica crónica, Enfermedad de Chagas.

Abstract

Chagas disease (CD) is caused by *Trypanosoma cruzi* and has an acute phase that can progress to the indeterminate and chronic phases. If the infected individual is not treated during the first two phases, 20% to 40% will develop the chronic phase. Treatment is effective only for the acute phase. Specifically, when developing chronic chagasic cardiomyopathy (CCC), which causes the highest morbidity in CD, there is no drug that reverses the damage caused by the parasite at the myocardial level. Recent studies have linked the TGF- β induced signalling pathway to the progression of CD. However, the variation in the expression of protein biomarkers involved along this pathway associated with progression to CCC and serve as predictors of CCC is not yet known. To fill this gap, the TGF- β pathway-associated biomarkers LOXL2, CTGF, AngII, and P38MAPK will be used. Overexpression of these biomarkers amplifies the activation of cardiac myocardial fibroblasts in response to infection and is crucial for the development of CCC. We asked how the relative abundance levels of these biomarkers vary across CD. We hypothesise that the change in expression from the acute phase to the development of CCC of at least one of the molecules will allow it to be used as a potential specific biomarker predictor for CCC. For this purpose, *Cavia porcellus*, an animal model that develops CD in a similar way to humans, will be used, making it possible to analyse biomarkers at the level of cardiac tissue and serum at different post-infection times. This will be done with the aim that in the future they can be used as biomarkers for predicting the risk of progression to CCC in humans.

Keywords: *Trypanosoma cruzi*, *Cavia porcellus*, transforming growth factor β , chronic chagasic cardiomyopathy, Chagas disease.

Estado del arte

1. Generalidades de la enfermedad de Chagas

La enfermedad de Chagas (EC) es un trastorno que puede afectar a múltiples órganos a nivel del sistema cardiovascular, digestivo y nervioso central. La EC es causada por la infección con el parásito *Trypanosoma cruzi* (Orden Kinetoplastida, Familia Trypanosomatidae), el cual, en zonas endémicas como Perú, se transmite principalmente cuando el vector triatomino infectado se alimenta mediante una picadura y, posteriormente, deposita sus heces con el parásito en la herida. Además, principalmente en países no endémicos, también se ha reportado transmisión por transfusiones de sangre, trasplante de órganos, por vía oral y congénita.¹

1.1. Desarrollo de la enfermedad, cuadro clínico y tratamiento:

La EC cuenta con diferentes fases post infección con el parásito. Después del periodo de incubación empieza la fase aguda de la enfermedad. En humanos, esta se caracteriza por tener una duración de aproximadamente dos meses y por presentar una fuerte respuesta inmunitaria, debido a su alta parasitemia. Durante este tiempo las manifestaciones clínicas más comunes son fiebre, dolor de cabeza, diarrea, linfadenopatía, hepatomegalia, esplenomegalia, entre otras. Al terminar este periodo, los niveles de parasitemia van a decrecer promoviendo que los síntomas sean más controlables. También es importante resaltar que algunos pacientes infectados pueden ser asintomáticos durante esta fase.¹

Luego, se desarrolla la fase indeterminada con una duración que se puede extender por décadas y que se caracteriza por tener bajos niveles de parasitemia, lo que ocasiona que no haya presencia de síntomas clínicos. De los pacientes infectados que se encuentran en esta fase aproximadamente el 30% pasará a la fase crónica.²

Finalmente, la fase crónica es donde se presentan más daños a nivel de los órganos, debido a la acumulación de daños durante la fase indeterminada. Las manifestaciones crónicas pueden afectar a nivel del corazón, tracto gastrointestinal y el sistema nervioso. La cardiomiopatía chagásica crónica (CCC) es la afección que se desarrolla de manera recurrente (20%-40%) con altos niveles de morbilidad y mortalidad entre los individuos infectados, debido a que ocasiona diversos daños a nivel cardiaco. Por otro lado, la afectación del tracto digestivo se debe principalmente al daño de los nervios que controlan este sistema, siendo las manifestaciones de megaesófago y megacolon las más presentadas. En cuanto al daño a nivel del sistema nervioso, no es común, pero puede generar problemas en la cognición como neuritis o demencia.^{1,2}

El tratamiento de la EC se centra en tratar directamente la infección por el parásito para así eliminar y prevenir la infección crónica. Los fármacos usados son el benznidazol (BNZ), como droga principal, y el nifurtimox, como alternativa. En fase aguda, el tratamiento es efectivo presentando tasas de éxito del 65% a 80%. Sin embargo, el tratamiento a base de BNZ, además de tener efectos tóxicos colaterales, es largo lo que puede generar que los pacientes abandonen el tratamiento, aumentando la posibilidad de resistencia al fármaco. En la fase crónica, el BNZ muestra una reducción de su eficacia y en pacientes con CCC no es capaz de mitigar el daño cardíaco. Por esta razón, es de suma importancia el descubrimiento de herramientas preventivas para la fase crónica.^{1,3}

1.2. Modelos animales

La EC sigue siendo un reto debido a que existen vacíos de conocimiento, principalmente en su tratamiento. Frente a esto nace la necesidad de realizar investigaciones usando modelos animales.⁴

Por predilección el modelo animal del ratón es el más utilizado para analizar la infección por *T. cruzi*. Sin embargo, la eficiencia de este modelo estará sujeta al linaje del

ratón y la cepa del parásito que se use. Esto hace cuestionable las extrapolaciones de los hallazgos en este modelo.⁴ Las principales diferencias halladas entre el modelo animal del ratón y el humano recaen en la forma en cómo progresa la EC. La fase crónica no se suele desarrollar en los ratones, a esto se suma que pueden presentar una alta letalidad en fase aguda. A diferencia de la forma en cómo se desarrolla la fase crónica en humanos, en el caso de ratones que logran llegar a esta fase, se ha visto la afectación simultánea de varios órganos. Además, algunos presentan manifestaciones crónicas del humano como la presencia de nidos de parásitos en los tejidos desde la fase aguda.⁵

Por esta razón, se ha postulado a *Cavia porcellus* (cobayo) como una nueva propuesta de modelo animal.⁵ El cobayo cuenta con una fisiología y una respuesta inmune similar al humano como lo reporta Padilla et al. Además, según Dasagrandhi et al. también tiene un gran parecido en cuanto a sus parámetros cardiovasculares, como en el potencial de acción ventricular. Adicionalmente, en la investigación de Clauss et al. mencionan similitudes en la producción de células inflamatorias al nivel del miocardio, uno de los desencadenantes de arritmias; entre otras manifestaciones clínicas y patologías que se mencionarán más adelante en la sección de alteraciones morfológicas. Además de lo mencionado, *C. porcellus* es un buen modelo para estudiar la EC debido a que desarrolla el ciclo de infección por *T. cruzi* como el humano, pero en un menor tiempo. Además, *C. porcellus* logra la supervivencia durante la fase aguda para luego pasar a la fase indeterminada y finalmente tener la posibilidad de desarrollar la fase crónica. Este modelo presenta una alta parasitemia en la fase aguda y un mayor daño al tejido cardíaco en la fase crónica, siendo esta la manifestación más frecuente según la investigación de Castro-Sesquen et al.^{5, 6, 7, 8,}

A pesar de que este modelo cuenta con algunas limitaciones debido a su novedad, como una menor cantidad de reactivos comerciales a comparación del modelo del ratón,

sigue siendo un modelo animal prometedora para la EC.⁵

2. Cardiomiopatía Chagásica crónica

La CCC, como se mencionó, es la afección más frecuente, siendo desarrollada por el 20-40% de los 6 millones de personas que se reportan estarían infectadas y es la principal causa de muerte. Existe una noción respecto a las alteraciones morfológicas y moleculares asociadas a la patología que causa el parásito a nivel de esta enfermedad, descritas líneas abajo.

Sin embargo, aún no se llega al entendimiento completo de la patogénesis debido a su complejidad ^{1,2,9}

2.1. Alteraciones morfológicas

Hasta nuestro entendimiento se sabe que la CCC presenta una compleja diversidad de manifestaciones clínicas y patologías que irán desarrollándose a lo largo del tiempo y dependen de muchas variables, tanto del parásito como del hospedero. Comenzando por la miocarditis que produce el estadio amastigote del parásito, además de remodelación miocárdica, proliferación de fibroblastos que aumenta el colágeno y favorecen la acumulación de matriz extracelular, provocando así fibrosis reactiva y reparativa; las alteraciones del movimiento de la pared cardíaca, aneurismas apicales, necrosis de coagulación de los cardiomiocitos, vasoespasmos, infiltración linfocítica continua, hipertrofia, disfunción diastólica y sistólica, pérdida de fibras miocárdicas, cambios ateroscleróticos y miocitolisis.^{1,2,10} Las manifestaciones de arritmias ventriculares, que pueden terminar con una muerte súbita cardíaca, y la insuficiencia cardíaca son las que generan mayor mortalidad entre los pacientes.

En cuanto al diagnóstico de CCC, según la OMS, se debe realizar al menos dos pruebas diferentes, junto a información epidemiológica, para evitar sobreestimaciones.

Debido a la baja carga parasitaria, característica de la fase crónica de la EC, las pruebas Gold standard para el diagnóstico son las pruebas serológicas, siendo ELISA la más utilizada. De haber discrepancia en los resultados, se debe realizar una tercera prueba, como PCR o Western blot.¹ El diagnóstico se puede complementar con pruebas de imagen, como electrocardiogramas, ecocardiografías, gammagrafías de perfusión miocárdica y resonancias magnéticas cardíacas.¹⁰

2.2. Alteraciones moleculares

En base a los cambios moleculares se conoce que se centran en las respuestas inmunológicas de los infectados, como migración de células inmunes a diversos tejidos, la activación de proteínas inflamatorias, producción de especies reactivas de oxígeno (ROS), entre otras. Además, a todos estos cambios se suman las alteraciones que ocasiona el parásito para interferir con la defensa del hospedero, como la destrucción de las células inmunes.^{2,11} La CCC se caracteriza por una sobreproducción de citoquinas debido al exceso de producción de ROS. Estas citoquinas tienen el carácter inflamatorio (TGF- β , IFN- γ , TNF- α e IL-6) y su sobreexpresión conlleva la acción conjunta de las células T CD8+ y los macrófagos con el fin de regular la infección. No obstante, la presencia en exceso de las células T CD8+ genera inflamación y agrava los daños a nivel cardíaco. Otras células que también causan inflamación del corazón, debido a su acción de defensa, son las T reguladoras.^{2,11,12} Cabe resaltar que los cambios moleculares e inmunológicos pueden modificarse dependiendo de la cepa del parásito y la constitución genética del hospedero. Por esta razón, es necesario tratar de seguir dilucidando la respuesta inmune frente a esta enfermedad y también cómo el parásito se adapta a ello.²

Actualmente, se han descrito varias vías de señalización celular que se asocian fuertemente a la progresión de la CCC. Entre ellas destacan la vía del interferón gamma (IFN- γ) y del factor de necrosis tumoral alfa (TNF- α). Ambas citoquinas, se encuentran

sobreexpresadas durante la progresión de CCC y presentan asociación con procesos importantes a nivel cardiaco, en especial tienen acción directa en la disfunción de mitocondrias durante CCC.¹³ A estas vías se suma la vía independiente de la caspasa 1 y se encarga principalmente de la producción de la interleuquina 1 beta (IL-1 β), esta citoquina tiene un papel fundamental en la matriz extracelular, la cual se ve afectada durante el desarrollo de la enfermedad.¹⁴ Finalmente, la vía del factor de crecimiento transformante beta (TGF- β), la cuál es una de las más estudiadas en la progresión de CCC. Varios autores consideran a TGF- β como un posible biomarcador predictor, pero no específico, debido a su alto nivel en la fase crónica, lo cual se asocia a un grave pronóstico. Por esta razón es de suma importancia seguir conociendo a más detalle esta vía.^{15, 16, 17}

3. Vía de TGF- β

3.1. Funciones en el humano

TGF- β es una citoquina pleiotrópica debido a su capacidad de desempeñar diversas funciones reguladoras importantes. Esta proteína homodimérica es secretada por la mayoría de las células en casi todas las fases de desarrollo. TGF- β participa en el control y regulación de la proliferación y diferenciación celular, la producción de matriz extracelular, el desarrollo embrionario, estimula la reparación de tejidos promoviendo el crecimiento de células epiteliales, modula la respuesta inmune y la apoptosis manteniendo la homeostasis.^{15, 18}

3.2. Vías

Debido a que TGF- β es secretado en su forma biológicamente inactiva, necesita unirse a receptores de membrana tipo I o II (TbRI, TbRII).^{15,18} Al estar activado por fosforilación del receptor, TGF- β , puede activar la vía dependiente de Smad (canónica) o la vía independiente de Smad (no canónica).¹⁶

3.2.1. Vía canónica

Esta vía se basa en la activación de las proteínas SMAD2/3, por acción del receptor mediante fosforilación. Ambas forman un complejo heterotrimérico con SMAD4, el cual es capaz de llegar al núcleo. En el núcleo se activan otras cascadas de señalización (colágeno I, fibronectina, etc.) y se regulan genes que interactúan con TGF- β .^{15, 18, 19, 20}

3.2.2. Vía no canónica

Esta vía se diferencia de la canónica debido a que el receptor de membrana activa proteínas distintas a Smad. Las vías alternativas más conocidas son en base a las proteínas quinasas activadas por mitógenos (MAPKs), entre ellas están la quinasa regulada por señales extracelulares (ERK), Jun N-terminal quinasa (JNK), quinasa activada por mitógenos 38 (p38), fosfatidilinositol 3 quinasa (PI3K), entre otras.^{15, 18, 19, 20}

3.3. Biomarcadores asociados a la vía de TGF- β

Han surgido nuevas investigaciones sobre biomarcadores en la EC con el fin de encontrar nuevas herramientas para el pronóstico de la CCC.²¹ Algunos estudios proponen a potenciales biomarcadores predictores como Galectina-3(Gal-3), Metaloproteinasas de la matriz extracelular (MMPs) e inhibidores tisulares de las metaloproteinasas (TIMPs). Debido a que la proteína Gal-3 es expresada por diversas células y tejidos, su sobreexpresión está asociada a la mortalidad en diversas cardiopatías, no solo en la CCC. Sin embargo, existen discrepancias sobre la correlación entre Gal-3 y la fibrosis cardiaca que aún faltan aclarar.^{10, 16, 22} En cuanto a MMPs, como MMP-2 y 9, estas se ven sobre activadas por acción de TGF- β generando la remodelación de la matriz extracelular y producción de colágeno cardiaco, además de disminuir la expresión de TIMPs, generando así un desequilibrio en MMP/TIMP.^{15, 16, 24}

Por otro lado, en la literatura se encontró que existen otras moléculas asociadas a la vía de TGF- β , como la proteína Lisil-oxidasa homóloga 2 (LOXL2), el Factor de

crecimiento del tejido conectivo (CTGF), la Angiotensina II (AngII), y la Proteína quinasa activada por mitógenos 38 (P38MAPK). Sin embargo, no se ha reportado cómo estos biomarcadores se expresan a lo largo de las diferentes fases de la EC.

Estudios como el de Bertaud et al., Luquetti et al., y Hong et al. hablan de cómo la sobreexpresión de LOXL2 influye en el aumento de los niveles de TGF- β , ambos relacionados con la remodelación miocárdica.^{16, 22, 23} Otros estudios, como el de Hoffman et al., Waghbi et al., Hong et al., y Hillege et al. también hablan de cómo por la vía no canónica p38MAPK existe la triada AngII/TGF- β /CTGF. Donde la AngII es una hormona generada en todo el cuerpo que se relaciona con el aumento del estrés oxidativo y puede influenciar a TGF- β por las vías canónica y no canónica;¹⁶ mientras que CTGF, a diferencia de LOXL2 y AngII, será modulada por TGF- β por ambas vías;^{12, 16, 23, 25} y por último p38MAPK, la cual juega un rol en la expresión de genes pro fibróticos. Es así como en esta triada AngII está aumentando los niveles de TGF- β y CTGF siendo así que favorece la actividad de los fibroblastos cardiacos pudiendo terminar en el desarrollo de CCC.¹⁶

Todas estas moléculas aún requieren de más estudios para una descripción completa de su expresión a lo largo del curso de la EC.

Problema de investigación

La EC, con 6 millones de personas infectadas, 70 millones en riesgo de infectarse y 12 mil muertes anuales, según aproximaciones de la OPS/OMS del 2022,⁹ la convierte en una preocupación de salud pública no sólo en países endémicos como nuestro país, sino también a nivel mundial, debido a la migración de individuos infectados de zonas endémicas a zonas no endémicas. Debido a los casos asintomáticos, la prevalencia se podría ver subestimada. Aproximadamente entre 20% y 40% de los sintomáticos

desarrollan la manifestación de CCC, la cual presenta una mayor tasa de morbilidad y mortalidad. Esta forma de la fase crónica se caracteriza por tener un alto proceso inflamatorio que causa daño a nivel del miocardio. Las manifestaciones clínicas de esta enfermedad se centran en lo que es insuficiencia cardiaca, arritmias, eventos de tromboembolismo y muerte cardiaca súbita.^{1, 10}

Considerando el gran impacto negativo que tiene el llegar a desarrollar CCC en la salud de los infectados, es preocupante que no se cuente con un tratamiento efectivo para esta manifestación crónica. Aún más, teniendo en cuenta que el daño que causa el parásito a nivel del miocardio no se puede revertir. Por ello es necesario contar con biomarcadores predictores del desarrollo de una CCC y evitar que el individuo infectado desarrolle la fase crónica.^{1, 10}

En base a la necesidad de un método predictivo para la CCC, han surgido estudios con relación a biomarcadores que sirvan para este propósito. Frente a esto, nacen estudios sobre TGF- β , una citoquina profibrótica. En el año 2002 un estudio, a cargo de Araujo et al., encontró niveles elevados de TGF- β en pacientes en diferentes fases de la EC, considerándolo como una nueva herramienta y posible blanco preventivo.²⁶ Años después, Ferreira et al. (2016) observaron más a fondo la señalización de la vía TGF- β durante la fase aguda de la EC, sugiriendo la importancia de la expresión de este factor en la progresión de la enfermedad, debido a que una sobreexpresión conlleva un mayor almacenamiento de colágeno y fibrosis.¹⁹ Además, en 2019 Silva et al. estudiaron los mecanismos que regulan TGF- β como SMAD2 y p38 en cultivos de células cardiacas, expresando también la importancia de seguir estudiando esta vía para obtener una mayor comprensión de ella en la progresión de la EC.²⁰ No obstante, TGF- β no sólo tiene un rol antagonista. En un organismo sano, TGF- β se encarga de diversas funciones celulares y también juega un papel relevante en la preservación de la estructura cardiaca. Por esta

razón, inhibir la expresión de TGF- β para evitar la progresión de la EC es arriesgado y no viable.^{12, 27}

Con relación a esto, recientemente han surgido estudios que evalúan diferentes biomarcadores asociados a la vía de TGF- β a lo largo de la EC. En el estudio de Luquetti et al. se han evaluado biomarcadores fibróticos como GAL-3, NT-pro BNP, troponina, y LOXL2 en relación con el desarrollo del daño cardíaco en pacientes con la EC, llegando a postular a GAL-3 como un muy posible biomarcador predictivo.²² Otra investigación importante, a cargo de Medeiros et al., sugiere a MMP-2 y MMP-9, evaluados a nivel tisular, como posibles biomarcadores potenciales para predecir la progresión de la EC.²⁴ No obstante, aún no hay estudios que evalúen la variación en los niveles de abundancia relativa de proteína de biomarcadores asociados a la vía de TGF- β que puedan ser predictores directos para la CCC. Debido a estos antecedentes, hemos seleccionado estos biomarcadores LOXL2, CTGF, Angll, y P38MAPK, los cuales también están asociados a TGF- β y cuentan con la característica común de potenciar la actividad fibrótica a nivel del miocardio.^{12, 16, 27}

A la fecha, no se conoce cuándo comienza la alteración en la expresión de estos biomarcadores a lo largo de la EC, lo que nos lleva a plantearnos la siguiente incógnita: ¿Cómo varía la expresión de LOXL2, CTGF, Angll, y P38-MAPK a lo largo de la EC? Debido a los antecedentes recién mencionados hipotetizamos que el cambio significativo en la expresión desde la fase aguda hasta el desarrollo de CCC de por lo menos una de las moléculas, LOXL2, CTGF, Angll, y P38-MAPK, la hará un potencial biomarcador predictor específico para CCC.

El objetivo de la presente propuesta de investigación es determinar si los biomarcadores LOXL2, CTGF, Angll, y P38-MAPK podrían servir como predictores específicos del riesgo de progresión a CCC. Para ello, analizaremos longitudinalmente en

diferentes tiempos post infección con *T. cruzi*, a nivel de suero y tejido cardíaco, los biomarcadores en *C. porcellus* a lo largo del desarrollo de la EC.^{28, 29, 30, 31} Este es un novedoso modelo capaz de desarrollar la EC de manera similar al humano en diversos aspectos como las fases de presentación/progresión de la EC, la parasitemia, la respuesta inmunológica, entre otras.^{5,10}

Esta investigación se realiza con la finalidad de que en el futuro se puedan utilizar los biomarcadores como herramientas predictoras de riesgo de progresión a CCC en humanos, ayudando a prevenir la generación de los daños irreversibles causados por la CCC.

Estrategia de abordaje

La estrategia metodológica se basa en un estudio longitudinal que consiste en medir y comparar la expresión de biomarcadores proteicos proteicos a nivel de suero y tejido cardíaco en *C. porcellus* en diferentes tiempos post infección con *T. cruzi*. El estudio iniciará con la infección por vía intraperitoneal de tripomastigotes sanguíneos de *T. cruzi* en *C. porcellus*, siguiendo las consideraciones éticas correspondientes, en un laboratorio con un nivel de bioseguridad tipo 2. Los animales se dividirán en dos grupos: el grupo sano o control y el grupo infectado, en ambos se harán tres subdivisiones tomando en cuenta el tiempo post infección (agudo, indeterminado y crónico). Para evaluar las variaciones en la expresión de los biomarcadores de interés de interés (LOXL2, CTGF, Angll, y P38-MAPK) a lo largo de las fases de las fases de la EC, se realizarán diferentes pruebas inmunológicas y moleculares para detectar los diferentes biomarcadores; éstas se replicarán para cada grupo en muestras de sangre para obtener suero y tejido cardíaco. Los animales serán eutanizados siguiendo los protocolos de eutanasia del Comité Institucional de Ética para el Uso de Animales (CIEA) de la UPCH. Las muestras de suero

se obtendrán mediante la toma de sangre, que se irán almacenando para hacer la detección de biomarcadores usando ELISA. Paralelamente, se recolectará el tejido cardíaco, que se dividirá en tres porciones para detectar los biomarcadores usando diferentes técnicas: una para inmunohistoquímica, otra para transcriptómica y otra para Western blot. Finalmente, por pruebas estadísticas se evaluarán los resultados obtenidos de cada prueba para determinar si existen diferencias estadísticamente significativas entre los grupos post infección y el grupo control.^{5, 12, 18} Para realizar las técnicas propuestas cada uno de estos biomarcadores serán detectados por reactivos comerciales dirigidos para *C. porcellus* que se pueden obtener de las empresas como Invitrogen, Abcam, Enzo, My BioSource, Biorbyt, entre otras.

Referencias bibliográficas:

1. Echeverria LE, Morillo CA. American Trypanosomiasis (Chagas Disease). *Infect Dis Clin North Am.* 2019;33(1):119-134. DOI: 10.1016/j.idc.2018.10.015
2. Bonney KM, Luthringer DJ, Kim SA, Garg NJ, Engman DM. Pathology and Pathogenesis of Chagas Heart Disease. *Annu Rev Pathol.* 2019;14:421–447. DOI: 10.1146/annurev-pathol-020117-043711.
3. Dzul-Huchim VM, Ramirez-Sierra MJ, Martinez-Vega PP, Rosado-Vallado ME, Arana-Argaez VE, Ortega-Lopez J, Gusovsky F, Dumonteil E, Cruz-Chan JV, Hotez P, Bottazzi ME, Villanueva-Lizama LE. Vaccine-linked chemotherapy with a low dose of benznidazole plus a bivalent recombinant protein vaccine prevents the development of cardiac fibrosis caused by *Trypanosoma cruzi* in chronically-infected BALB/c mice. *PLoS Negl Trop Dis.* 2022;16(9):e0010258. DOI: 10.1371/journal.pntd.0010258.
4. Chatelain E, Konar N. Translational challenges of animal models in Chagas disease drug development: a review. *Drug Des Devel Ther.* 2015; 9:4807-23. DOI: 10.2147/DDDT.S90208.
5. Castro-Sesquen YE, Gilman RH, Yauri V, Angulo N, Verastegui M, Velásquez DE, Sterling CR, Martin D, Bern C. *Cavia porcellus* as a model for experimental infection by *Trypanosoma cruzi*. *Am J Pathol.* 2011;179(1):281-288. DOI:10.1016/j.ajpath.2011.03.043
6. Padilla-Carlin DJ, McMurray DN, Hickey AJ. The guinea pig as a model of infectious diseases. *Comp Med.* 2008;58(4):324–340. PMID: PMC2706043
7. Dasagrandhi D, RASK R, Muthuswamy A, Lennox AM, Jayavelu T, Devanathan V, Kesavan Swaminathan J. Ischemia/reperfusion injury in male guinea pigs: An efficient model to investigate myocardial damage in cardiovascular

- complications. *Biomed Pharmacother.* 2018;99:469–479. DOI: 10.1016/j.biopha.2018.01.087
8. Clauss S, Bleyer C, Schüttler D, Tomsits P, Renner S, Klymiuk N, Wakili R, Massberg S, Wolf E, Kääh S. Animal models of arrhythmia: classic electrophysiology to genetically modified large animals. *Nat Rev Cardiol.* 2019;16(8):457–475. DOI: 10.1038/s41569-019-0179-0
 9. Organización Panamericana de la Salud (OPS). La enfermedad de Chagas es endémica en 21 países de las Américas. [En línea]. OPS; [24Nov2023]. Disponible en: <https://www.paho.org/es/temas/enfermedad-chagas#:~:text=La%20enfermedad%20de%20Chagas%20es%20end%C3%A9mica%20en%2021%20pa%C3%ADses%20de,se%20infectan%20durante%20la%20gestaci%C3%B3n>
 10. Chaves AT, Menezes CAS, Costa HS, Nunes MCP, Rocha MOC. Myocardial fibrosis in chagas disease and molecules related to fibrosis. *Parasite Immunol.* 2019;41(10):e12663. DOI: 10.1111/pim.12663
 11. Lannes-Vieira J. Multi-therapeutic strategy targeting parasite and inflammation-related alterations to improve prognosis of chronic Chagas cardiomyopathy: a hypothesis-based approach. *Mem Inst Oswaldo Cruz.* 2022;117:e220019. DOI: 10.1590/0074-02760220019.
 12. Hoffman KA, Reynolds C, Bottazzi M, Hotez P, Jones K. Improved Biomarker and Imaging Analysis for Characterizing Progressive Cardiac Fibrosis in a Mouse Model of Chronic Chagasic Cardiomyopathy. *J Am Heart Assoc.* 2019;8(22):e013365. DOI: 10.1161/JAHA.119.013365.
 13. Nunes JPS, Andrieux P, Brochet P, Almeida RR, Kitano E, Honda AK, Iwai LK, Andrade-Silva D, Goudenège D, Alcântara Silva KD, Vieira RdS, Levy D,

- Bydlowski SP, Gallardo F, Torres M, Bocchi EA, Mano M, Santos RHB, Bacal F, Pomerantzeff P, Laurindo FRM, Teixeira PC, Nakaya HI, Kalil J, Procaccio V, Chevillard C, Cunha-Neto E. Co-Exposure of Cardiomyocytes to IFN- γ and TNF- α Induces Mitochondrial Dysfunction and Nitro-Oxidative Stress: Implications for the Pathogenesis of Chronic Chagas Disease Cardiomyopathy. *Front Immunol.* 2021;12:755862. DOI: 10.3389/fimmu.2021.755862.
14. Medeiros NI, Pinto BF, Elói-Santos SM, Teixeira-Carvalho A, Magalhães LM, Dutra WO, Correa-Oliveira R, Gomes JAS. Evidence of Different IL-1 β Activation Pathways in Innate Immune Cells From Indeterminate and Cardiac Patients With Chronic Chagas Disease. *Front Immunol.* 2019;10:800. DOI: 10.3389/fimmu.2019.00800
15. Ferreira RR, Waghbi MC, Bailly S, Feige JJ, Hasslocher-Moreno AM, Saraiva RM, Araujo-Jorge TC. The Search for Biomarkers and Treatments in Chagas Disease: Insights From TGF-Beta Studies and Immunogenetics. *Front Cell Infect Microbiol.* 2022;11:767576. DOI:10.3389/fcimb.2021.767576.
16. Bertaud A, Joshkon A, Heim X, Bachelier R, Bardin N, Leroyer AS, et al. Signaling Pathways and Potential Therapeutic Strategies in Cardiac Fibrosis. *Int. J. Mol. Sci.* 2023;24(2):1756. DOI:10.3390/ijms24021756
17. Waghbi MC, Ferreira RR, Abreu RDS, Degrave W, de Souza EM, Bailly S, Feige JJ, de Araújo-Jorge TC. Transforming growth factor- β as a therapeutic target for the cardiac damage of Chagas disease. *Mem Inst Oswaldo Cruz.* 2022;117:e210395. DOI: 10.1590/0074-02760210395.
18. Ferreira RR, Abreu RDS, Vilar-Pereira G, Degrave W, Meuser-Batista M, Ferreira NVC, da Cruz Moreira O, da Silva Gomes NL, Mello de Souza E, Ramos IP, Bailly S, Feige JJ, Lannes-Vieira J, de Araújo-Jorge TC, Waghbi MC. TGF-

- β inhibitor therapy decreases fibrosis and stimulates cardiac improvement in a pre-clinical study of chronic Chagas' heart disease. *PLoS Negl Trop Dis.* 2019;13(7):e0007602. DOI: 10.1371/journal.pntd.0007602.
19. Ferreira R, de Souza EM, de Oliveira FL, Ferrão PM, Gomes LH, Mendonça-Lima L, et al. Proteins involved on TGF- β pathway are up-regulated during the acute phase of experimental Chagas disease. *Immunobiology.* 2016;221(5):587-594. DOI:10.1016/j.imbio.2016.01.009
 20. Silva TA, Ferreira LFC, Pereira MCS, Calvet CM. Differential Role of TGF- β in Extracellular Matrix Regulation During *Trypanosoma cruzi*-Host Cell Interaction. *Int J Mol Sci.* 2019;20(19):4836. DOI: 10.3390/ijms20194836.
 21. Echeverría LE, Rojas LZ, Gómez-Ochoa SA, Rueda-Ochoa OL, Sosa-Vesga CD, et al. Cardiovascular biomarkers as predictors of adverse outcomes in chronic Chagas cardiomyopathy. *PLoS One.* 2021;16(10):e0258622. DOI: 10.1371/journal.pone.0258622.
 22. Luquetti AO, de Oliveira DEC, do Nascimento Tavares SB, de Oliveira EC. Evaluation of Four Biomarkers in Patients Chronically Infected with *Trypanosoma cruzi* and Their Relationship with Disease Progression. *Am J Trop Med Hyg.* 2022;106(5):1434–41. DOI: 10.4269/ajtmh.21-0620.
 23. Hong Y, Yang AL, Wong JKS, Masodsai K, Lee SD, Lin YY. Exercise intervention prevents early aged hypertension-caused cardiac dysfunction through inhibition of cardiac fibrosis. *Aging (Albany NY).* 2022;14(10):4390-4401. DOI:10.18632/aging.204077.
 24. Medeiros NI, Gomes JAS, Fiuza JA, et al. MMP-2 and MMP-9 plasma levels are potential biomarkers for indeterminate and cardiac clinical forms progression in chronic Chagas disease. *Sci Rep.* 2019;9:14170. DOI: 10.1038/s41598-019-

50791-z.

25. Hillege MMG, Galli Caro RA, Offringa C, de Wit GMJ, Jaspers RT, Hoogaars WMH. TGF- β Regulates Collagen Type I Expression in Myoblasts and Myotubes via Transient Ctgf and Fgf-2 Expression. *Cells*. 2020;9(2):375. DOI: 10.3390/cells9020375.
26. Araújo-Jorge TC, Waghabi MC, Hasslocher-Moreno AM, Xavier SS, Higuchi ML, Keramidas M, Bailly S, Feige JJ. Implication of Transforming Growth Factor- β 1 in Chagas Disease Myocardiopathy. *J Infect Dis*. 2002;186(12):1823–1828. DOI: 10.1086/345882.
27. Erasmus M, Samodien E, Lecour S, Cour M, Lorenzo O, Dlodla P, et al. Linking LOXL2 to Cardiac Interstitial Fibrosis. *International Journal of Molecular Sciences*. 2020;21(16):5913. DOI:10.3390/ijms21165913
28. Loxl2 lysyl oxidase like 2 [*Cavia porcellus* (domestic guinea pig)] [Internet]. 2023 [cited 2023Nov24]..Disponible en: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/100729973>
29. Ccn2 cellular communication network factor 2 [*Cavia porcellus* (domestic guinea pig)] [Internet]. [cited 2023Nov24].. Disponible en: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/100726380/>
30. Agtr1 angiotensin II receptor type 1 [*Cavia porcellus* (domestic guinea pig)] - Gene - NCBI [Internet]. 2023 [cited 2023Nov24].. Disponible en: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/100192325/#reference-sequences>
31. Xue J, Ye J, Xia Z, Cheng B. Effect of luteolin on apoptosis, MAPK and JNK signaling pathways in guinea pig chondrocyte with osteoarthritis. *Cell Mol Biol (Noisy-le-grand)*. 2019; 65(6):91-5. DOI: <http://dx.doi.org/10.14715/cmb/2019.65.6.15>