



# UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

---

---

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES CUAUTITLÁN

**Expresión de microRNA en exosomas de plasma de  
ratones CD1 infectados con *Trypanosoma cruzi* cepa  
Hueypoxtla en fases aguda y crónica asintomática de  
la enfermedad de Chagas**

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:

LICENCIADA EN BIOQUÍMICA  
DIAGNÓSTICA

P R E S E N T A:

**DAISY ALÍ SALDAÑA DE LA CRUZ**

ASESORES:

M. EN C. MARTHA ALICIA BALLINAS  
VERDUGO

QFB. ALEJANDRO GUTIERREZ GARCÍA

CUAUTITLÁN IZCALLI,  
ESTADO DE MÉXICO, 2018



Universidad Nacional  
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

**Biblioteca Central**



**UNAM – Dirección General de Bibliotecas**  
**Tesis Digitales**  
**Restricciones de uso**

**DERECHOS RESERVADOS ©**  
**PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL**

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.



Este trabajo se desarrolló en el departamento de Inmunología del Instituto Nacional de Cardiología (INC), bajo la dirección de la M. en C. Martha Alicia Ballinas Verdugo.





*- Antes de convencer al intelecto,  
es imprescindible tocar y predisponer el corazón.  
B. Pascal.*

A mi Luz. Tu esfuerzo y sacrificios merecen el mérito de todo lo bueno que he logrado, admiro tu fortaleza y la pasión con la que cuidas y defiendes a tu familia, eres mi guía y mi pilar mamá. gracias por tus genes, amor y protección. Te amo mujer.

### **AGRADECIMIENTOS:**

- A mi *alma mater* por darme una excelente formación y abrirme las puertas de muchos lugares, por convertirse en mi casa y permitirme conocer en ella a mis mejores amigos. Gracias UNAM

- A mis padres, por tantas lecciones de vida, gracias por el empeño que han puesto en mi educación, por todos los sacrificios y no escatimar en nada para mi formación. Son inspiración.

- A mis hermanitos, gran parte de lo que soy es por ustedes, me motivan a seguir superándome, gracias por compartir conmigo tantas risas.

- Griselda, gracias por el cariño y todo el apoyo, soy muy feliz de tenerte conmigo.

- A Eric por tanto apoyo y por tu incondicionalidad en todo momento.

- A la Maestra Martha Ballinas, por compartir conmigo sus conocimientos y experiencia, no tengo palabras para agradecer su confianza y apoyo. Mi estancia en INC me dejó tantas lecciones gracias a su dedicación y paciencia.

-Al profesor Alejandro por su enorme apoyo y orientación, por ser un mentor durante mi formación profesional. Gracias por su asesoría en este trabajo.

-A la Doctora Sandra, Maestra Sandra, Maestra Maritere y a la profesora Larisa por brindarme grandes conocimientos durante mi formación profesional, asesoría y su tiempo dedicado para este trabajo.

-A todos mis amiguitos por influir en diferentes aspectos de mi vida, por estar siempre presentes en momentos tormentosos y hacerme tan feliz. Los quiero. Especial agradecimiento a C y F por todo su apoyo durante esta etapa universitaria.



## ÍNDICE:

<b>I. LISTA DE ABREVIATURAS.....</b>	<b>6</b>
<b>II. INTRODUCCIÓN</b>	
<b>1. Enfermedad de Chagas.....</b>	<b>8</b>
<b>1.1 Fases Clínicas de la enfermedad de Chagas.....</b>	<b>10</b>
<b>1.1.2 Fase aguda.....</b>	<b>10</b>
<b>1.1.3 Fase crónica.....</b>	<b>12</b>
<b>2. Etiología de la enfermedad de Chagas.....</b>	<b>15</b>
<b>2.1 Vector.....</b>	<b>16</b>
<b>2.2 Agente causal.....</b>	<b>17</b>
<b>2.2.1 Ciclo biológico.....</b>	<b>18</b>
<b>3. Diagnóstico de la enfermedad de Chagas.....</b>	<b>20</b>
<b>4. Exosomas.....</b>	<b>21</b>
<b>4.1 Biogénesis.....</b>	<b>22</b>
<b>4.2 Secreción.....</b>	<b>24</b>
<b>5. miRNA.....</b>	<b>26</b>
<b>5.1 Biogénesis.....</b>	<b>26</b>
<b>5.2 miRNA exosomal.....</b>	<b>28</b>
<b>III. ANTECEDENTES Y JUSTIFICACIÓN DEL TRABAJO.....</b>	<b>30</b>
<b>IV. OBJETIVOS</b>	
<b>1. Objetivo general.....</b>	<b>32</b>
<b>2. Objetivos particulares.....</b>	<b>32</b>



## **V. METODOLOGÍA**

<b>1. Obtención de las muestras sanguíneas de ratones.....</b>	<b>33</b>
<b>2. Extracción de miRNA´s.....</b>	<b>34</b>
<b>3. Cuantificación de miRNAs.....</b>	<b>37</b>
<b>4. ANÁLISIS ESTADÍSTICO.....</b>	<b>38</b>
<b>VI. RESULTADOS.....</b>	<b>39</b>
<b>VII. DISCUSIÓN.....</b>	<b>42</b>
<b>VIII. CONCLUSIONES.....</b>	<b>51</b>
<b>IX. REFERENCIAS.....</b>	<b>52</b>



## I. LISTA DE ABREVIATURAS

- 3' UTR: Región 3' no traducida
- AGTR1: Angiotensina II tipo 1
- AKT: Proteína Cinasa B
- Bcl-2: Proteína antiapoptótica del linfoma B2
- CCC: Cardiomiopatía chagásica crónica
- CD: Cardiomiopatía dilatada
- CI: Corazón isquémico
- CMV: Cuerpos multivesiculares
- DNA: Ácido desoxirribonucleico
- dpi: Después de infección
- ECG: Electrocardiograma
- ECh: Enfermedad de Chagas
- ELISA: Ensayo por inmunoabsorción ligado a enzimas
- ESC: Células madre
- ESCRT: Complejo de clasificación endosomal para el transporte
- FoxO3a: Caja O3 de Forkhead
- HAI: Hemoaglutinación indirecta
- IAM: Infarto agudo de miocardio
- ICC: Insuficiencia cardíaca chagásica
- IFI: Inmunofluorescencia indirecta
- IgG: Inmunoglobulina G
- LLC: Leucemia linfocítica crónica
- miRISC: Mecánica del silenciamiento génico mediado por miRNA
- miRNA: microRNA
- nSMase2: Esfingomielinasa neuronal 2
- PCR: Reacción en cadena de la polimerasa
- PDNF: Factor neurotrópico derivado del parásito
- PI3K : Fosfatidilinositol 3-cinasas
- RMC: Resonancia magnética cardiovascular



- RNA: Ácido ribonucleico
- dcRNA : RNA de doble cadena
- iRNA: RNA interferente
- mRNA: RNA mensajero
- SMC: Células del músculo liso vascular
- SNARE: Complejo de receptores solubles de proteínas de unión a proteína de fusión sensibles a N-etilmaleimida
- TGF- $\beta$ : Factor de crecimiento transformante beta
- Trk: Receptores Tirosin Cinasa
- VE: Vesículas extracelulares
- VIL: Vesículas intraluminales
- $\alpha$ -SMA:  $\alpha$ -actina de músculo liso
- $\alpha$ MHC: Cadena pesada de la  $\alpha$ -miosina
- $\beta$ MHC: Cadena pesada de la  $\beta$ -miosina







En México en el período de 2000-2012 se han registrado 5 mil 463 casos de enfermedad de Chagas de los cuales 247 fueron agudos, 171 crónicos con síntomas y 5 mil 45 crónicos sin síntomas (SINAVE, 2015).

Chiapas, Oaxaca, Veracruz y Yucatán reportan más de 50 casos cada uno sumando agudos, crónicos con síntomas y crónicos sin síntomas; con 11 a 50 casos le siguen Jalisco, Michoacán, Morelos, Estado de México, Guanajuato, Nuevo León y Quintana Roo (SINAVE, 2015).

Con 30 defunciones, la tasa de mortalidad anual es de 0.03 por 100 mil habitantes, manteniéndose en esa cifra desde 2007 (SINAVE, 2015).

La ECh está asociada a múltiples factores sociales y ambientales que exponen a millones de personas a contraer dicha enfermedad, entre los principales factores en vastas áreas de América Latina, se destacan: habitar en viviendas mal estructuradas, principalmente en zonas rurales y suburbanas, carecer de recursos, residir en áreas de pobreza con inestabilidad social y económica, y muchas veces con altas tasas de migración, así como pertenecer a grupos vinculados con el trabajo agrícola de cosecha (OPS, 2016; WHO, 2018).

Esta enfermedad contribuye a perpetuar un ciclo de pobreza, al reducir la capacidad de aprendizaje, la productividad y la posibilidad de generar ingresos. Durante muchas décadas, la ECh fue una enfermedad estrictamente rural, sin embargo, los cambios socioeconómicos, la migración, la deforestación y la urbanización han transformado el perfil epidemiológico de la enfermedad en un fenómeno más urbano (OPS, 2016; WHO, 2018).

Además de ser una enfermedad prevalente con relevancia clínica y epidemiológica tanto en América Latina como en países desarrollados, la ECh también es importante debido a su carga económica. Su importancia económica se debe a la incapacidad laboral y mortalidad que a menudo ocurre en la población más productiva, los adultos jóvenes, lo cual se traduce en una pérdida económica significativa (Pereira et al, 2013; Rassi et al, 2009).



A medida que la enfermedad se expande más allá de América Latina, existe una creciente preocupación por su carga económica global. Un estudio estima que los costos globales en dólares de atención de la enfermedad resultan en un promedio anual cercano a los \$7.19 billones USD, donde la carga principal reside en el diagnóstico y tratamiento de los casos crónicos. La carga mundial de la ECh parece ser sustancial al compararla con cifras de carga global de otras enfermedades: (\$6.7 billones USD para el cáncer de útero, \$4.7 billones USD para el cáncer de cuello uterino, y \$2 billones USD para la enfermedad por el rotavirus) (Lee et al, 2013; Ramsey et al, 2003).

### 1.1 FASES CLÍNICAS DE LA ENFERMEDAD DE CHAGAS

La ECh cursa dos periodos evolutivos claramente identificados: fase aguda o de primo-infección y la fase crónica (indeterminada o latente y determinada). La fase aguda se presenta en el 100% de los individuos durante los primeros meses, pasando luego a la fase crónica indeterminada que se prolonga de 15 a 30 años, permaneciendo en esta situación alrededor del 75% de los casos chagásicos, mientras que el 25% restante evoluciona a la fase crónica determinada de la enfermedad con las lesiones irreversibles especialmente a nivel cardíaco debido a la interacción de múltiples factores patogénicos (WHO, 2018; Storino, et al 1994).

#### 1.1.2 FASE AGUDA

La fase aguda de la enfermedad comienza cuando el *T. cruzi* entra en el cuerpo por picadura del vector, este periodo se presenta de manera más severa, sobre todo en niños menores de seis años, en los cuales puede causar la muerte debido en particular a alteraciones del sistema nervioso central como meningoencefalitis, letal en 50% de los casos, y trastornos cardíacos como miocarditis (Becerril, 2014).

Por lo general, el periodo de incubación dura de 3 a 10 días y se pueden encontrar parásitos en la circulación sanguínea en un lapso de 4 a 6 meses donde es posible el diagnóstico por observación directa del parásito en frotis con giemsa (Becerril, 2014).



Está ampliamente demostrado que en más del 90% de los casos la forma de entrada pasa inadvertida o bien tiene una primo infección cutánea no perioftálmica (Becerril, 2014; Storino, et al 1994). Sin embargo se pueden presentar algunos signos cuando se ha infectado por picadura del vector, denominados en conjunto "puerta de entrada" como el chagoma de inoculación, caracterizado por la presencia de un proceso inflamatorio agudo localizado en el sitio de infección, y que produce una induración dolorosa y eritematosa o edema bpalpebral, unilateral con adenopatía preauricular que se conoce como signo de Romaña, mismo que aparece cuando la infección tiene lugar en la conjuntiva ocular (Figura 3). Ambos signos son autolimitados y desaparecen en un periodo de 30 a 60 días (Becerril, 2014; Storino, et al 1994).



**Figura 3: Signo temprano de Romaña. Tomada de Uribarren, 2018.**

Otras manifestaciones posibles de la enfermedad en esta fase incluyen fiebre, dolor de cabeza, agrandamiento de ganglios linfáticos, palidez, dolores musculares, dificultad para respirar, hinchazón y dolor abdominal o torácico. Estos signos desaparecen espontáneamente en la mayoría de los casos después de 4 a 8 semanas sin secuelas aparentes (WHO, 2018; Garza, 2015).

La fase aguda puede manifestarse durante la transfusión de un donante con sangre infectada entre días o semanas después de la misma. En estos casos no hay reacción cutánea en el portal de entrada, y la mayoría de los casos son asintomáticos (Garza, 2015).



### 1.1.3 FASE CRÓNICA

La segunda fase existe en dos formas, la fase crónica asintomática o indeterminada, en la que la parasitemia es baja y difícil de detectar. Esta corresponde a la etapa que sigue a la fase aguda, se caracteriza porque el paciente no presenta síntomas ni signos viscerales y raramente los estudios parasitológicos directos son positivos (Sosa et al, 1999).

El paciente puede permanecer toda la vida en esa etapa o manifestar la fase crónica sintomática al cabo de 10 a 30 años, la mayoría de los pacientes con esta forma de la enfermedad tienen entre 20 y 50 años. Tan sólo un 30% de los pacientes desarrolla la fase sintomática, mientras que el resto permanece como forma asintomática durante toda su vida. Las razones por las cuales unos individuos infectados evolucionan hacia el daño orgánico, depende de la patogenia multifactorial de la enfermedad (WHO, 2002; Gascón et al, 2007; Storino, et al 1994).

Debido a la escasa carga del parásito en la sangre, las pruebas serológicas más utilizadas para su detección en esta etapa son: ensayo por inmunoabsorción ligado a enzimas (ELISA), hemoaglutinación indirecta (HAI) e inmunofluorescencia indirecta (IFI) (WHO, 2002; Storino, et al 1994).

La segunda forma de la fase crónica se conoce como fase crónica sintomática. Esta etapa se caracteriza por las alteraciones definitivas e irreversibles, alrededor del 30% de los pacientes tras la fase crónica asintomática desarrolla alteraciones cardíacas, un 10% alteraciones digestivas o ambas (forma mixta) y menos del 5%, una forma neurológica (Gascón et al, 2007).

La cardiomiopatía chagásica crónica (CCC) es la forma más grave de la enfermedad ya que es la afectación más común en esta fase, generando arritmias, aneurismas ventriculares, insuficiencia cardíaca (ICC), tromboembolismo y bloqueos a nivel del sistema de conducción del corazón (Jörg et al, 2002).

La ECh es la causa de miocardiopatía infecciosa más frecuente del mundo, donde los gastos de atención, estudio, tratamiento y rehabilitación de los pacientes en Latinoamérica, sumado

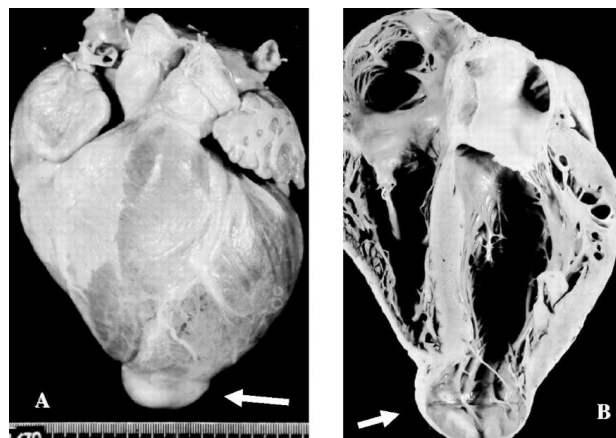


a los costos de ausencia de mano de obra (por incapacidad física o discriminación laboral), son mayores a los necesarios para el control de la enfermedad (Jörg et al, 2002; Marin et al, 2007).

La patogenia de la CCC todavía no está bien esclarecida. Una respuesta inmunológica descontrolada y el constante daño directo del parásito producen un daño microvascular, en los miocardiocitos y en el tejido nervioso que terminan causando trastornos del ritmo, zonas de fibrosis y dilataciones cardíacas (Molina et al, 2015).

Las primeras manifestaciones de la CCC suelen ser anomalías del sistema de conducción, con mayor frecuencia bloqueo de rama derecha o bloqueo fascicular anterior izquierdo y disfunción diastólica. La CCC suele ser la causa principal de bloqueo auriculoventricular en los países de América Latina y es causada específicamente por la fibrosis diseminada del sistema de conducción (Pererira et al, 2013).

La CCC presenta algunas características diferenciales con otras cardiopatías más comunes. Se de una cardiomiopatía dilatada con tendencia a la formación de aneurismas, sobre todo apicales (Figura 4), tiene un gran potencial arritmogénico, presenta una elevada frecuencia de fenómenos tromboembólicos. En la evolución natural de la enfermedad, las alteraciones cardíacas aparecen de forma progresiva alrededor de los 20 años de infección (Torreani, 2013).



**Figura 4: A, vista macroscópica externa de la CCC con protuberancia apical típica. B, sección frontal del mismo corazón con el aneurisma apical típico. Tomada de Marin et al, 2007.**



En las formas más avanzadas de CCC con ICC hay tromboembolismo. Por este motivo, se originan embolias pulmonares, cerebrales, renales, esplénicas y mesentéricas. Cuando este proceso se instala en un paciente hemodinámicamente alterado, puede morir (Apt, 2013).

A nivel gastrointestinal, la ECh puede afectar a cualquier parte del tubo digestivo, siendo los órganos más comúnmente afectados el colon y el esófago. La frecuencia con la que produce afectación digestiva varía entre el 5 y el 35% (Molina et al, 2015; Storino, et al 1994).

La disfagia es el principal síntoma de la afectación esofágica. En los casos extremos, el esófago se elonga, en las etapas avanzadas este órgano prácticamente no transporta su contenido por lo que los pacientes se desnutren. Las complicaciones de la esofagopatía son la neumopatía por regurgitación, esofagitis por irritación y la rotura del órgano (Apt, 2013).

Los pacientes con afectación colónica por la ECh presentan estreñimiento progresivo, y se observa dilatación colónica o megacolon. Tanto el recto como el sigma están afectados en la mayor parte de los pacientes con afectación colónica. El síntoma principal del megacolon chagásico es la estitiquéz progresiva. Otros síntomas son meteorismo y disquecia. Las principales complicaciones son: fecaloma, impactación fecal y vólvulos del sigmoides. Al igual que en el esófago, existen trastornos motores por la mayor denervación, la zona acalásica origina megacolon y a veces dolico colon. En los estados avanzados los pacientes pueden estar hasta 3 meses sin evacuar (Molina et al, 2015; Apt, 2013).



**Figura 5: Megacolon por ECh crónico de hombre de 51 años. Colon de 10 cm de diámetro, con inflamación y engrosamiento no uniforme. Tomada de Palmer, 2003.**



La patogenia detrás de la afectación digestiva es una pérdida del sistema nervioso entérico lo que da lugar a trastornos motores y dilataciones localizadas. En esta fase, el parásito provoca un proceso inflamatorio, que daña los plexos intramurales reduciendo las células ganglionares y fibras nerviosas tanto del plexo submucoso como mientérico (Madrid et al, 2004).

Se estima que alrededor del 30% de los pacientes chagásicos presentan distintos grados de alteración del sistema nervioso autónomo. La disautonomía es la expresión más frecuente de la afectación del sistema nervioso, la denervación puede afectar tanto al sistema parasimpático como al simpático y puede presentarse en forma aislada o asociada con la cardiomiopatía y megavísceras (Storino, et al 1994).

Debido a la disautonomía, los pacientes chagásicos se ven privados de la acción inhibitoria tónica que normalmente ejerce el sistema parasimpático en el nódulo sinusal y también carecen del mecanismo mediado vagalmente para responder a los cambios transitorios en la presión sanguínea (Rassi et al, 2009).

La despoblación neuronal intensa se ha demostrado en varios estudios patológicos desde principios de la década de los 20's. Se ha postulado que la pérdida neuronal en la enfermedad cardíaca de Chagas ocurre predominantemente durante la fase aguda, con la participación de 3 mecanismos: parasitismo directo de neuronas, degeneración por inflamación perigangliónica y reacción autoinmune neuronal (Marin et al, 2007).

## 2. ETIOLOGÍA DE LA ENFERMEDAD DE CHAGAS

En la naturaleza, *T. cruzi* se transmite vectorialmente a través de la picadura de diversas especies de chinches triatóminos infectadas. No obstante, se han descrito otros mecanismos de transmisión no vectorial a través de productos sanguíneos, el trasplante de órganos y la transmisión vertical. En las zonas donde la infección es endémica, también se ha descrito la transmisión oral por la ingestión de alimentos contaminados con heces de las chinches infectadas (Gascón et al, 2007).





## 2.1 VECTOR

Chagas demostró que el vector del *T. Cruzi*, era un insecto triatómino, conocido por diversos nombres locales como barbeiro, vinchuca, chipo, pito, y en México conocido como chinche besucona, triatoma, ajediente entre más de 20 nombres. Los Triatóminos son una subfamilia de insectos perteneciente a la familia Reduviidae del orden Hemiptera. La principal característica biológica de los triatóminos, es su obligada hematofagía. Todas las especies del Triatómino son consideradas vectores potenciales del agente etiológico de la ECh, pero las más importantes son aquellas que se han adaptado a vivir en lugares de residencia humana y con cortos intervalos de alimentación y defecación (Garza, 2015; Paz et al, 2005).

Para vivir, los triatóminos. se alimentan, desde que nacen hasta que mueren, exclusivamente de sangre. Estos insectos tienen una particularidad ya que se alimentan de noche y por el día permanecen en sus nidos. Algunas especies son propensas a defecar mientras se alimentan (*Rhodnius prolixus*, *Triatoma infestans*, *T. barberi*, *T. dimidiata*, entre otras); otras defecan al poco tiempo o incluso abandonan su fuente de alimento dejando las heces lejos del sitio de succión. Este comportamiento determina si son buenos o malos transmisores de la ECh (Campos et al, 2017).

Entre los insectos vectores de importancia epidemiológica en México, se encuentran: *Triatoma barberi*, *T. dimidiata*, *T. pallidipennis*, *T. longipennis*, *T. infestans*, *T. mazzotti*, *T. mexicana*, *T. gearslaeckeri*, *T. picturata*, *Rhodnius prolixus*, *Dipetalogaster maxima* y *Panstrongylus* spp (Uribarren, 2018).



**Figura 8: Diferentes especies de transmisores de *T. cruzi* en México. Tomada de Uribarren, 2018.**



Debido a que no existe una vacuna para la ECh, el control integrado de vectores es el método más eficaz de prevenir la ECh en América Latina, incluyendo control químico por insecticidas en domicilios infestados, mejora de las casas y su peridomicilio e información educación y comunicación a la comunidad sobre el tema. El control del vector ha tenido efectos positivos en algunas zonas endémicas; sin embargo, la creciente resistencia de las chinches a los insecticidas utilizados, así como la falta de continuidad de los programas de control, han resultado en la reinfestación. Por consiguiente, es necesario continuar con los esfuerzos y la investigación dirigidos al desarrollo de fármacos, vacunas efectivas y para el mejoramiento de las medidas de control del vector (OPS, 2016; Campos et al, 2017).

## 2.2 AGENTE CAUSAL

La ECh es causada por la infección del protista *Trypanosoma cruzi*. El género *Trypanosoma* se compone de varias especies de protozoos. Los organismos pertenecientes a este género pertenecen al filum Sarcomastigophora, subfilo Mastigophora, orden Kinetoplastidae, que comprende organismos flagelares con un kinetoplasto, el *T. cruzi*, se incluye en la sección estercerosa debido a que sus etapas infecciosas se desarrollan en el tracto digestivo de los vectores (Brener, 1992; WHO, 2002).

*T. cruzi* comprende un amplio conjunto de poblaciones que circulan entre sus vectores y reservorios. A través del estudio de *T. cruzi* de diversos hospederos se han demostrado variaciones morfológicas, virulencia, susceptibilidad a fármacos, constitución antigénica y capacidad de infección, llegando a la conclusión de que la multiplicación del parásito es asexuada, lo que genera una serie de poblaciones, que exhiben diferencias genéticas con gran impacto sobre las propiedades biológicas del parásito (Montecinos, 2007).

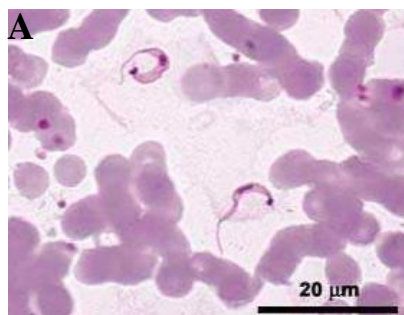
El número de clones de *T. cruzi* es ilimitado, sin embargo las poblaciones de *T. cruzi* se reparten en dos principales linajes mediante la caracterización bioquímica de las cepas. Así la electroforesis isoenzimática han permitido caracterizar las poblaciones en relación con sus zimodemas. El zimodema 1 (Z1) es característico de las cepas de animales silvestres y de los triatomas, mientras que zimodema 2 (Z2) se encuentra en las cepas del hombre y de los animales domésticos (Salomon, 2011; Montecinos, 2007).



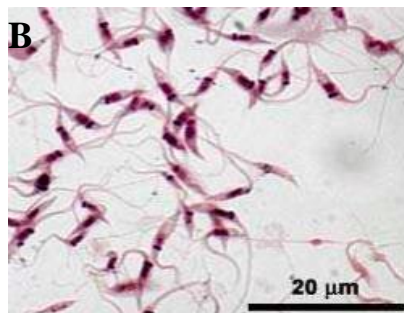
### 2.2.1 CICLO BIOLÓGICO

El ciclo biológico de *T. cruzi* es complejo ya que incluye etapas tanto en el vector como en el hospedador, además se caracteriza por su gran variabilidad antigénica. Sus moléculas de membrana cambian constantemente durante su desarrollo, lo que demuestra una complejidad biológica, llevando al parásito a tener diversos mecanismos de supervivencia ante cualquier hospedero y sus vectores (La Fuente, 2006).

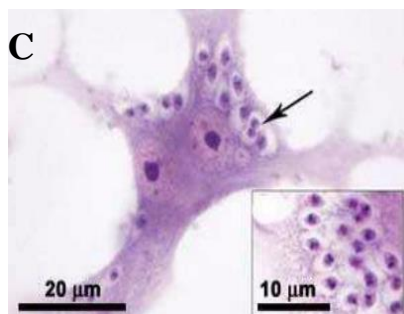
En los diversos hospederos mamíferos, en el insecto vector y en los medios de cultivo, *T. cruzi* presenta tres formas evolutivas con diferentes características morfológicas:



**Tripomastigote:** Forma no replicativa, se encuentra en el vector y en el humano. Los tripomastigotes sanguíneos pueden infectar macrófagos por un evento fagocítico y también otros tipos celulares por un evento dirigido por el parásito y mediado por receptores (Apt, 2013; Becerril, 2014).



**Epimastigote:** Forma replicativa no infectante para el humano. forma alargada, con un kinetoplasto a nivel de núcleo, del cual emerge un flagelo. Se observan en el intestino del vector y pueden ser encontrados en células de vertebrados al inicio o final de cada ciclo intracelular (Apt, 2013; Becerril, 2014).



**Amastigote:** Forma replicativa intracelular capaz de infectar otras células, se produce en el vertebrado, los parásitos se localizan en vacuolas acídicas tomando una forma redondeada, su flagelo se encuentra secuestrado en la vacuola y presenta un gran núcleo y kinetoplasto (Apt, 2013; Becerril, 2014).

**Figura 6. A. Imagen microscópica de tripomastigote sanguíneo de *T. cruzi* en placa de cultivo. B. Imagen microscópica de epimastigote de *T. cruzi*. C. Imagen microscópica de amastigote de *T. cruzi* en células de bazo de ratón. Tomada de Montecinos, 2007.**

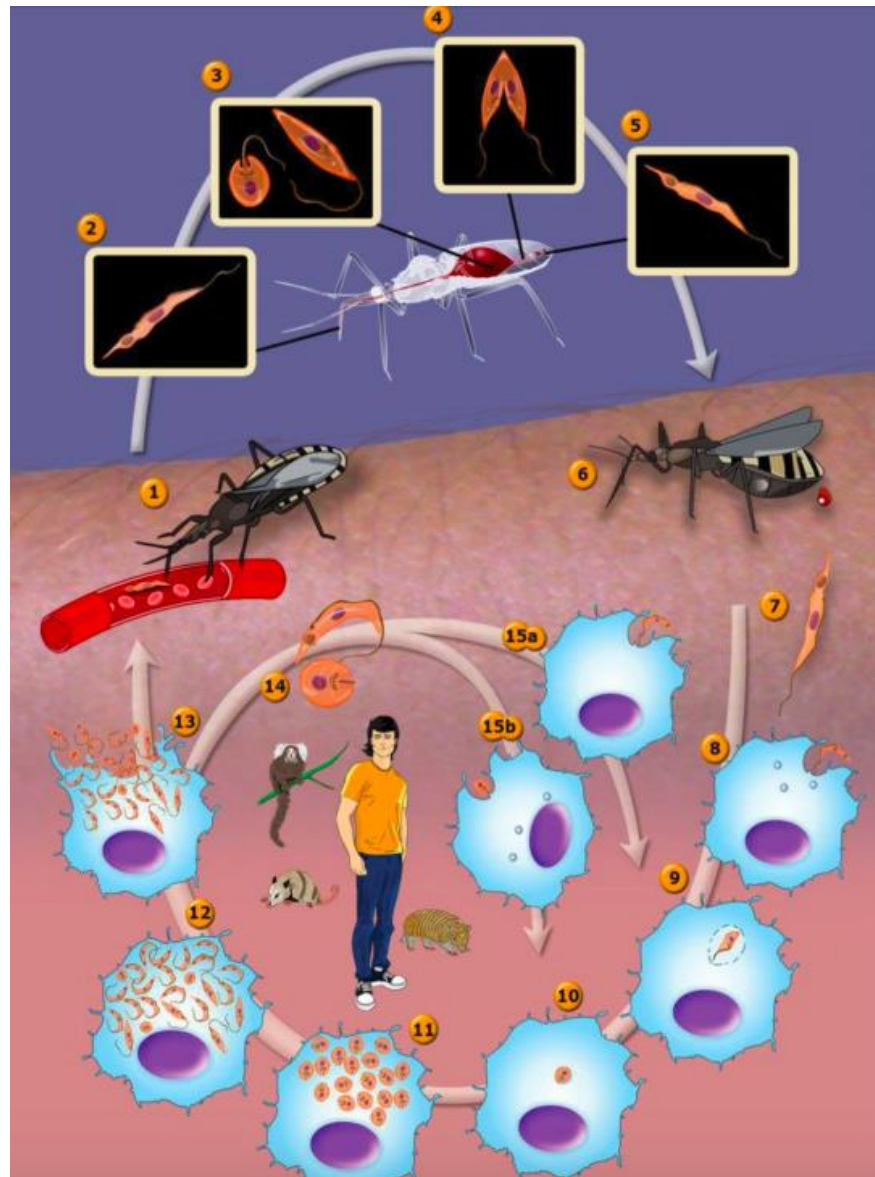


Figura 7. El ciclo de vida de *T. cruzi*. 1. El vector pica a un huésped mamífero e ingiere tripomastigotes; 2. Tripomastigotes metacíclicos; 3. Tripomastigotes se transforman en epimastigotes; 4. Los epimastigotes se multiplican en el intestino; 5. Los epimastigotes se transforman en tripomastigotes metacíclicos en el intestino posterior; 6. El vector pasa los tripomastigotes metacíclicos en las heces cerca de un sitio de picadura después de alimentarse de sangre de un mamífero; 7. Forma de tripomastigotes metacíclicos; 8. Tripomastigote infecta células; 9. Tripomastigote se transforma en amastigote; 10. Amastigote se libera de la vacuola parasitófora; 11. Los amastigotes se multiplican en el citoplasma; 12. Los amastigotes se transforman en tripomastigotes; 13. Tripomastigotes salen de la célula; 14. Se forman amastigotes y tripomastigotes; 15. (a) Tripomastigotes; (b) Los amastigotes infectan macrófagos. Tomada de Souza, 2017.



La infección vectorial ocurre mientras el vector infectado se alimenta del hospedador vertebrado (humano o animales). Inmediatamente después de succionar la sangre, el vector defeca liberando los parásitos y el prurito causado por la picadura del triatómino facilita mediante microlesiones de la piel y/o mucosas la entrada del parásito a sistema circulatorio, produciendo la infección, que comienza como una fase aguda. Los tripomastigotes metacíclicos se dirigen a diversos tejidos (presentan afinidad a tejido muscular), donde invaden las células. Dentro de las células, los tripomastigotes pierden su flagelo y se redondean para formar amastigotes, los cuales se multiplican intracelularmente por fisión binaria. Cuando los amastigotes casi llenan la célula, se transforman en tripomastigotes, los cuales son liberados a los espacios intersticiales y al torrente sanguíneo, rompiendo las células, generando diversos daños orgánicos al hospedero o bien pueden ser ingeridos por el insecto vector durante una nueva picadura al hospedador, comenzando nuevamente un ciclo (Apt, 2013; Becerril, 2014).

En el intestino medio del insecto, los tripomastigotes sanguíneos se diferencian a epimastigotes, y en el resto del tracto digestivo se diferencian a tripomastigotes metacíclicos (Apt, 2013).

En la naturaleza es posible que algunos animales sean infectados, mediante la picadura o la ingesta de vectores, lo que los convierte en reservorios del parásito. Los reservorios clásicos del ambiente peridomiciliar y domiciliar que son atrayentes como fuente alimentaria para los triatóminos como perros, roedores, gallinas y otros animales, pueden crear la condición de riesgo (Apt, 2013; Cohen, 2001).

### 3. DIAGNÓSTICO DE LA ENFERMEDAD DE CHAGAS

El diagnóstico de laboratorio de la ECh depende de la fase en la que se encuentre el paciente. En la etapa aguda y en la reactivación durante la fase crónica, la parasitemia es elevada, por lo que el diagnóstico se basa en la detección del parásito por métodos directos en sangre periférica y, de manera excepcional en líquido cefalorraquídeo. La microscopia directa de sangre periférica en fresco permite visualizar al tripomastigote en movimiento. También se pueden realizar diferentes tinciones como giemsa o Wright. La sensibilidad se



puede incrementar mediante técnicas de concentración, como microhematocrito o el método de Strout. Otras técnicas cada vez más en desuso incluyen el hemocultivo y el xenodiagnóstico, técnicas que están solo disponibles en laboratorios especializados y que se emplean para investigación (Apt, 2013; Molina et al, 2015).

Debido a que en la fase crónica los niveles de parasitemia disminuyen, el diagnóstico se basa en la detección de anticuerpos IgG anti-*T.cruzi*, ya que los métodos parasitológicos directos suelen ser negativos en un 30 a 60% de los pacientes. Las técnicas serológicas utilizan como antígenos tanto el parásito completo o extractos purificados, como antígenos recombinantes o péptidos sintéticos. Las técnicas más empleadas son IFI, HAI y ELISA, siendo esta última la que alcanza valores más óptimos de sensibilidad y especificidad (Molina et al, 2015).

En las últimas décadas, la detección de DNA de *T.cruzi* en sangre periférica mediante la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) se ha utilizado cada vez más. En la fase aguda de la enfermedad o en la reactivación durante la fase crónica ha resultado ser de gran utilidad, ya que tiene una sensibilidad mayor que las técnicas parasitológicas clásicas. Por otro lado, un resultado negativo no excluye la infección (Molina et al, 2015).

Sin embargo, ninguna de las pruebas mencionadas anteriormente alcanza un 100% de sensibilidad y especificidad. En 2002, la OMS estableció que para lograr un diagnóstico de la ECh en fase crónica debía realizarse mediante 2 pruebas serológicas realizadas por diferentes métodos (WHO, 2002).

#### 4. EXOSOMAS

La comunicación intercelular es una característica esencial de los organismos multicelulares y puede ser mediada a través del contacto directo célula-célula o por la transferencia de moléculas. En las últimas dos décadas, ha surgido un tercer mecanismo de comunicación intercelular que implica la transferencia de vesículas extracelulares (VE). Como resultado, tales vesículas tienen un impacto en los procesos fisiológicos, incluida la regulación de la plasticidad de células madre (Raposo & Stoorvogel, 2013; Lee et al, 2012).



Recientemente, el interés en la biología de vesículas extracelulares ha crecido enormemente y muchos han descrito diferentes tipos de vesículas dependiendo de sus propiedades biofísicas y de la biogénesis (Lee et al, 2012).

Los exosomas son partículas pequeñas homogéneas que varían de 40 a 100 nm de tamaño, que derivan de la vía endocítica y se liberan al ambiente extracelular después de la fusión de los endosomas tardíos, también conocidos como cuerpos multivesiculares (CMV) con la membrana plasmática. En la última década, a los exosomas se les han atribuido funciones en la propagación de proteínas, lípidos, RNA mensajero (mRNA), microRNA (miRNA) y DNA (James, 2016; Hessvik & Llorente, 2018; Lee et al, 2012).

Rose Johnstone, una pionera en el campo molecular, eligió el término "exosoma" en 1987 porque "el proceso parecía ser similar a la endocitosis inversa, con contenido vesicular interno liberado en contraste con moléculas externas internalizadas en estructuras unidas a la membrana" (Pettersen & Llorente, 2018).

#### 4.1 BIOGÉNESIS

Para liberar exosomas, se deben completar varios pasos celulares; formación de vesículas intraluminales (VIL) en CMV, transporte de CMV a la membrana plasmática y fusión de CMV con la membrana plasmática. Varias moléculas han sido implicadas en estos procesos, pero debido a desafíos metodológicos, no es fácil distinguirlas experimentalmente, y en muchos estudios no está claro en qué etapa opera cada molécula (Pettersen & Llorente, 2018).

La biogénesis del exosoma comienza dentro del sistema endosomal. A medida que el endosoma temprano madura y se desarrolla en el endosoma tardío, se caracteriza por la formación de VIL dentro de la luz del endosoma, los VIL se forman mediante la invaginación de la membrana endosomal, en la cual se engloba al azar porciones del contenido citosólico y se incorporan proteínas transmembranales y periféricas. Al endosoma tardío que contiene VIL también se le conoce como cuerpo multivesicular (CMV). El destino del CMV puede variar. Típicamente, se fusionan con lisosomas y su contenido se



degrada por la hidrólisis. Se ha propuesto que los contenidos del CMV contienen proteínas destinadas a la degradación por los lisosomas y proteínas que pueden tener otra función o funciones que se encuentran fuera de los VIL del CMV. Sin embargo, el mecanismo por el cual ocurre este proceso todavía no se comprende completamente (Beach, 2014; Hessvik & Llorente, 2018).

Como alternativa a la fusión con los lisosomas, el CMV puede fusionarse con la membrana plasmática de la célula en una propuesta de dependencia iónica, liberando sus VIL de forma exocítica al entorno extracelular (Beach, 2014)

El complejo de clasificación endosomal para el transporte (ESCRT) es importante en este proceso. ESCRT consiste en un conjunto de complejos de proteína citosólica que son reclutados a los endosomas por proteínas de membrana que han sido marcadas generalmente con ubiquitina en sus dominios citosólicos. La etiqueta de ubiquitina es reconocida por el complejo ESCRT-0, que así se recluta a la membrana endosomal y transfiere cargas ubiquitinadas a ESCRT-I, uno de cuyos componentes, Tsg101, también reconoce ubiquitina. El reclutamiento de la maquinaria ESCRT actúa para agrupar las proteínas de carga ubiquitinadas en el endosoma e inducir la curvatura de la membrana endosomal para formar VIL (Hessvik & Llorente, 2018; James, 2016).

Las VIL pueden formarse en ausencia de ESCRT, por lo que deben existir otros medios para generar VIL, aunque los mecanismos para su generación son menos claros. La generación de estos VIL independientes de ESCRT requiere la tetraspanina CD63, una proteína abundante en VIL pero con una función poco clara, y puede verse facilitada por las propiedades de los lípidos como la ceramida (James, 2016).

La biogénesis de los exosomas a menudo se ha descrito como un mecanismo dependiente o independiente de ESCRT, pero las vías pueden no estar completamente separadas, sin embargo podrían funcionar sinérgicamente, y diferentes subpoblaciones de exosomas podrían depender de diferentes mecanismos (Pettersen & Llorente, 2018).





## 4.2 SECRECIÓN

Las maquinarias implicadas en la liberación de MV de la membrana plasmática, la movilización de CMV a la periferia de la célula, su acoplamiento y fusión con la superficie celular se encuentran aún en una etapa temprana de comprensión. Estos procesos requieren el citoesqueleto (actina y microtúbulos), motores moleculares asociados (kinesinas y miosinas), interruptores moleculares (pequeñas GTPasas) y la maquinaria de fusión (SNARE) (Raposo & Stoorvogel, 2013). El transporte de CMV a la membrana plasmática depende de su interacción con la actina y el citoesqueleto de los microtúbulos. Se ha demostrado que la caída o sobreexpresión de la cortactina disminuye o aumenta la liberación de exosomas, respectivamente (Hessvik & Llorente, 2018).

Rab GTPasas, la familia más grande de pequeñas GTPasas, regulan muchos pasos del tráfico de membranas, incluida la incrustación de vesículas, el transporte de vesículas a lo largo de la actina y la tubulina, así como la fusión de membranas. Curiosamente, se ha demostrado que varias Rab GTPasas desempeñan un papel en la secreción de exosomas, aunque se desconoce su mecanismo de acción preciso en este proceso (Hessvik & Llorente, 2018).

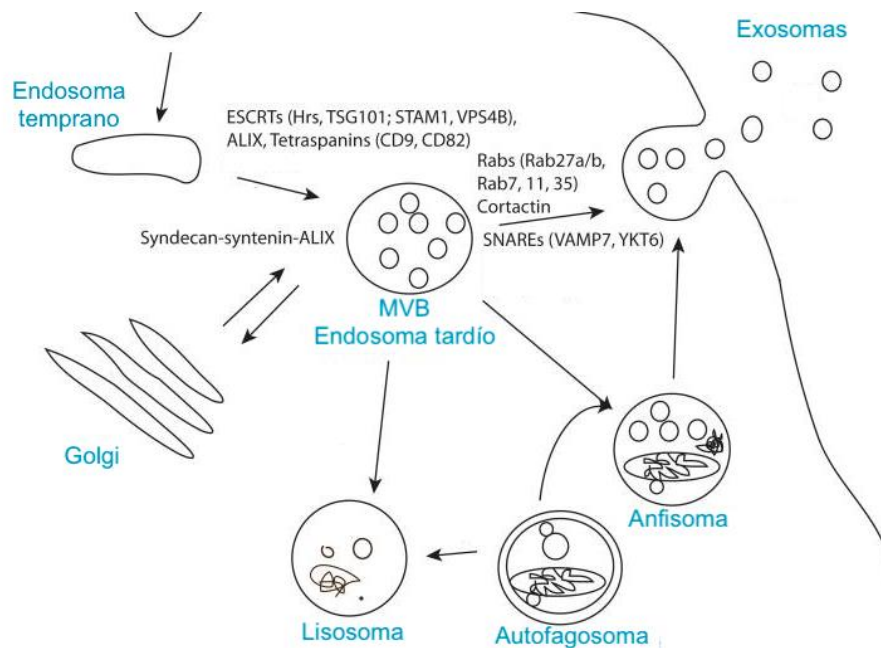
Los primeros indicadores para la participación de Rab GTPasas en la secreción de exosomas fueron de estudios sobre líneas celulares de reticulocitos, que requerían la función de Rab 11 para la secreción de exosomas. Más recientemente, se ha demostrado que la caída de Rab27a o Rab27b reduce significativamente la cantidad de exosomas secretados. También se ha demostrado que la desactivación de Rab GTPasa TBC1D10A-C y la interferencia con Rab35, reduce la secreción de exosomas. Cabe señalar que aunque Rab11, Rab27 y Rab35 parecen estar implicados en la liberación del exosoma, la inactivación selectiva de cada uno de estos Rabs solo afectó parcialmente a esta vía (Raposo & Stoorvogel, 2013).

Poco se sabe sobre la maquinaria que impulsa la fusión CMV con la membrana plasmática, sin embargo se ha demostrado que para que se pueda llevar a cabo se requiere del complejo de receptores solubles de proteínas de unión a proteína de fusión sensibles a N-etilmaleimida (SNARE). Las proteínas SNARE generan energía a través interacciones proteína-lípidos y proteína-proteína, que actúan como una fuerza impulsora para la fusión de membrana (Raposo & Stoorvogel, 2013).



Las proteínas SNARE facilitan la fusión de las vesículas con su membrana objetivo, como la membrana plasmática o la membrana de diferentes organelos. Está demostrado que la proteína de membrana VAMP7 es necesaria para la liberación de exosomas (Hessvik & Llorente, 2018).

Además, se ha demostrado que la adición de un precursor de éter lipídico que aumenta los niveles de lípidos de éter celular aumenta la liberación de exosomas de células. El mecanismo de este efecto no está claro, pero se ha sugerido anteriormente que los lípidos de éter están implicados en la fusión de membrana, y la mayor secreción del exosoma podría deberse a la fusión facilitada de CMV con la membrana plasmática. También se ha demostrado que la liberación de exosomas puede ser regulada por calcio. Algunas proteínas, como las sinaptotagminas, funcionan como sensores de calcio y se han implicado en el transporte vesicular. Curiosamente, se ha informado que un miembro de la familia sinaptotagminas afecta la liberación de exosomas (Hessvik & Llorente, 2018).



**Figura 9. Proceso de formación y expulsión de exosomas con moléculas involucradas. Adaptada de Hessvik & Llorente, 2018**



## 5. miRNA

Por convenio internacional, un miRNA se define como un RNA de cadena sencilla de 18 a 24 nucleótidos de longitud que es generado por la enzima Dicer, una RNAsa de tipo III, a partir de un transcrito endógeno que contiene una estructura de horquilla. Los miRNAs se localizan en exones e intrones de RNA no codificante, así como en intrones de mRNA codificante (Vázquez et al, 2006).

La acción de los miRNAs está mediada por unión a la región 3' no traducida (3'UTR) de los mRNA diana y, por lo tanto, regula la síntesis de proteínas (Turchinovich, 2013).

Enfoques experimentales indican que un miRNA puede apuntar a más de cien mRNA. Además, se predice que más del 60% de los genes codificadores de proteínas humanas contienen sitios de unión a miRNA dentro de sus 3' UTR. Por lo que los miRNAs constituyen una de las clases más abundantes de moléculas reguladoras de genes (Turchinovich, 2013; Haruhiko & Mikiko, 2010).

Una gran fracción de miRNA exhibe patrones de expresión estrictos específicos de diversos tejidos, y los niveles de muchos de estos miRNAs se alteran durante alguna enfermedad. Los miRNA están involucrados en una amplia gama de procesos fisiológicos y de desarrollo, por lo tanto, su desregulación está estrechamente relacionada con enfermedades humanas, como el cáncer (Turchinovich, 2013; Haruhiko & Mikiko, 2010).

### 5.1 BIOGÉNESIS

La biogénesis de los miRNA presenta varios pasos. Al inicio, los miRNA forman parte de una estructura de tallo y burbuja de aproximadamente 80 nt de longitud, que forma parte del pri-miRNA. Esta estructura es procesada en el núcleo por Droscha para liberar una horquilla más pequeña de aproximadamente 60 nt de longitud llamada pre-miRNA, la cual contienen una cap 5' y una cola de poly A 3'. Aún no se determina la forma exacta en la cual Droscha discrimina estructuras de tallo y burbuja de pre-miRNA y posteriormente determina el sitio exacto de la digestión (Vázquez et al, 2006; Turchinovich, 2013).

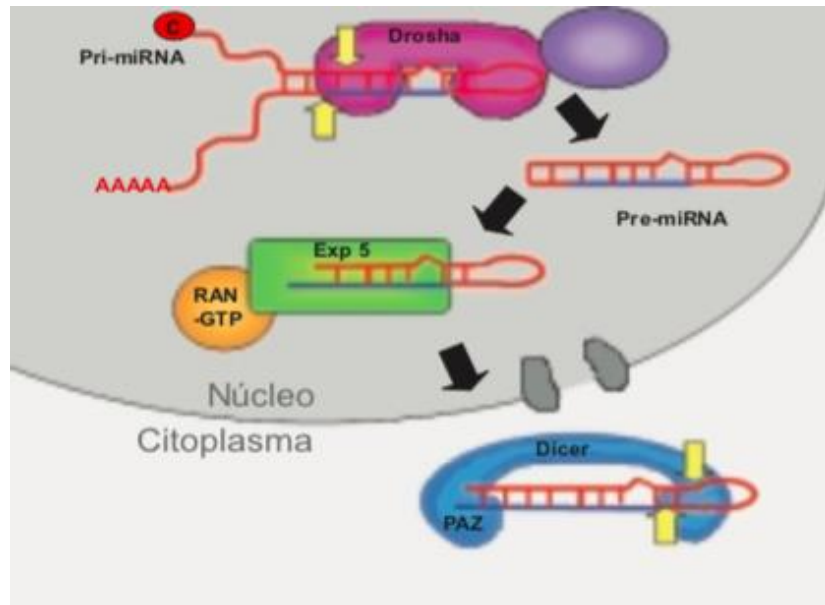


Drosha forma parte del complejo proteico de 600 kDa denominado microprocesador. Otro de los componentes esenciales del microprocesador, se denomina DGCR8. El microprocesador se presenta como un heterotetrámero y consiste principalmente en dos moléculas de Drosha y dos de DGCR8. La proteína DGCR8 contiene dos dominios de unión a RNA de doble cadena (dcRNA), sugiriendo que ésta puede jugar un papel importante en el reconocimiento o unión del complejo microprocesador (Turchinovich, 2013).

En el siguiente paso, los pre-miRNAs se transportan al citoplasma con ayuda de la Exportina 5 (Exp5) dependiente de Ran (una GTPasa). Exp5 forma un heterodímero nuclear con Ran-GTP y con los pre-miRNA que resultan del procesamiento de Drosha (Vázquez et al, 2006; Turchinovich, 2013).

En el citoplasma, Dicer juega un papel importante en la generación de los miRNA maduros, donde el dominio PAZ de Dicer se une a la cola cohesiva presente en la base de la horquilla de pre-miRNA, y el dominio de unión a dcRNA de Dicer se une a la base de la burbuja y define la distancia de la digestión desde la base. El procesamiento por Dicer genera RNA dúplex de aproximadamente 22 pb, que contienen dos colas cohesivas en el extremo 3'. Después de la digestión, Dicer permanece asociada con el miRNA intermediario de 22 pb y posteriormente es liberado por una helicasa (Figura 10) (Vázquez et al, 2006).

Finalmente, los miRNA se separan dejando una de las cadenas asociadas con una proteína Argonauta (AGO). Esta hebra asociada miRNA-AGO es capaz de unirse a secuencias específicas de mRNA complementarias, promoviendo su descomposición y la inhibición de la traducción (Turchinovich, 2013).



**Figura 10. Procesamiento de los miRNA. Tomada de Vázquez, 2006.**

## 5.2. miRNA EXOSOMAL

Numerosos experimentos han demostrado que los miRNA exosomales pueden afectar la expresión génica en las células receptoras y mediar una respuesta fisiológica. Los miRNA exosomales pueden existir de forma estable en la sangre, la orina y otros fluidos corporales de los pacientes (Turchinovich, 2013).

A inicios de 2018 la base de datos, ExoCarta (<http://www.exocarta.org>), enumera 2,838 miRNAs que se encontraron en exosomas de varias células.

Actualmente, existen cuatro teorías potenciales que explican el empaquetamiento de los miRNA en exosomas, aunque los mecanismos siguen siendo poco claros:

1. La vía dependiente de la esfingomielinasa neuronal 2 (nSMase2). Se ha encontrado que la sobreexpresión de nSMase2 aumenta la cantidad de miRNA exosomal y, a la inversa, la inhibición de la expresión de nSMase2 reduce el número de miRNA exosomal.
2. El motivo miRNA y las ribonucleoproteínas nucleares heterogéneas, ya que este



podría reconocer el motivo GGAG en la porción 3' de las secuencias de miRNA y causar que los miRNA específicos se empaqueten en exosomas.

3. Los extremos 3' de miRNA, diversos estudios indican que el extremo 3' de la secuencia de miRNA contiene una señal de clasificación crítica para su empaquetamiento en vesículas.
4. La mecánica del silenciamiento génico mediado por miRNA (miRISC). Es sabido que los miRNA maduros pueden interactuar con las proteínas de ensamblaje para formar un complejo llamado miRISC, cuyos principales componentes incluyen miRNA, mRNA, GW182 y AGO2. Estudios recientes reconocieron una posible correlación entre la clasificación de AGO2 y las cantidades de miRNA exosomal (Zhang et al, 2015).

La cantidad y composición de miRNA exosomal difieren entre los pacientes con enfermedades y los individuos sanos. Por lo tanto, los miRNA exosomales muestran potencial de uso como biomarcadores no invasivos para indicar estados de enfermedad. Varios estudios previos han perfilado miRNAs exosomales en diferentes muestras. Es de destacar que algunos miRNAs exosomal se pueden utilizar para ayudar en el diagnóstico clínico (Zhang et al, 2015).

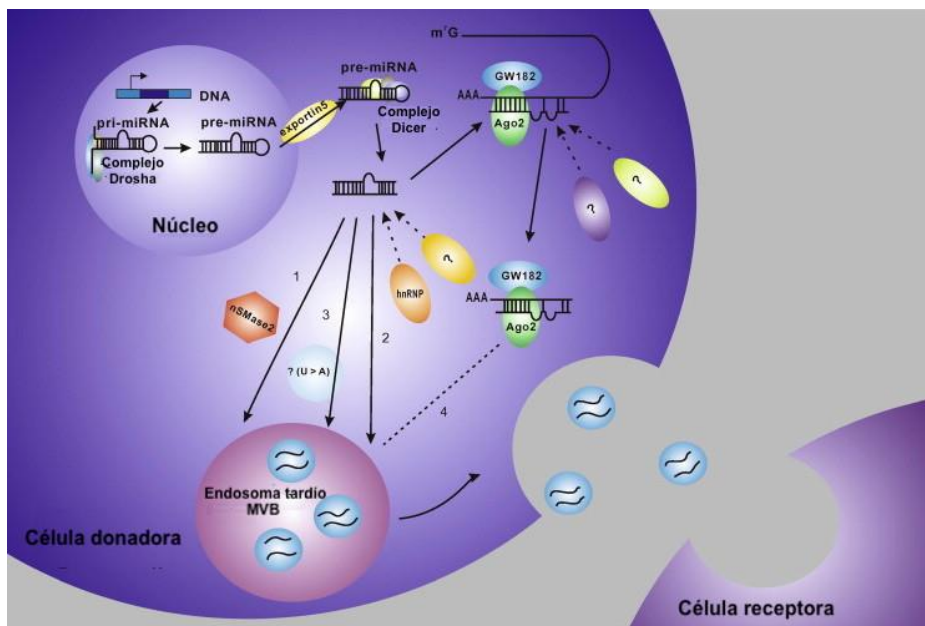


Figura 11 . Empaquetamiento de microRNA exosomal. Adaptada de Zhang, 2015.



### III. ANTECEDENTES Y JUSTIFICACIÓN DEL TRABAJO

La ECh es un ejemplo de lo que pueden alcanzar los esfuerzos de los sistemas nacionales de salud en cada país, de la movilización de la capacidad técnica y científica para enfrentar un gran problema de salud pública. Desde 1991, la conjunción de esfuerzos de los programas nacionales de control ha dado a luz los proyectos de cooperación horizontal entre países llamados Iniciativas Subregionales. Los logros alcanzados son muy relevantes, con la interrupción de la transmisión vectorial, la interrupción de la transmisión transfusional, el establecimiento de sistemas de vigilancia sobre nuevas formas de transmisión, y el aumento del acceso de los portadores a los servicios de diagnóstico y tratamiento. Pero aún queda mucho por hacer y mucho por pensar y construir, tanto para interrumpir la transmisión, así como abrir nuevos caminos a la investigación de la enfermedad, aunque cada día se está más cerca y el esfuerzo debe sostenerse.

A pesar de que los exosomas se identificaron en la década de 1980, los estudios sobre exosomas han aumentado en los últimos, especialmente después del descubrimiento de mRNA y miRNA funcionales en exosomas. Sin embargo, el estudio de los exosomas apenas está comenzando.

La presencia y concentración relativa de miRNA específicos en fluidos biológicos está relacionada con el estado fisiológico de diversos tejidos, lo cual podría explotarse para el diagnóstico específico de daño por agentes infecciosos definidos.

La combinación entre las características de los miRNAs debería despertar el interés en la detección de miRNA como herramientas de diagnóstico para las enfermedades parasitarias, una utilidad que ya se ha demostrado para otras enfermedades.

Los tres principales enfoques actualmente bien establecidos para el perfil de miRNAs que podrían utilizarse para este propósito son:

- PCR de transcripción inversa cuantitativa (qPCR)
- Métodos basados en la hibridación como matrices de miRNA



- El uso de microarreglos de miRNA para la caracterización de los niveles de expresión de miRNA en parásitos podría permitir la rápida identificación y caracterización de varios miRNA como posibles nuevos biomarcadores de infección, similares a los que se han logrado para la detección de cáncer en humanos.

Esto puede tener el potencial de mejorar el diagnóstico de enfermedades provocadas por parásitos y también proporcionar criterios de pronóstico a través del monitoreo de perfiles de expresión específicos, destacando el impacto de los miRNA en el diagnóstico molecular (Manzano & Siles, 2012).

Sorprendentemente, algunas de las secuencias de miRNA identificadas en parásitos ya han mostrado potencial para su identificación específica de especie, aunque la respectiva presencia y abundancia de miRNA definidos no se han evaluado hasta la fecha en individuos infectados (Manzano & Siles, 2012).

Actualmente se cuenta con un número que supera los 1,300 miRNAs asociados a enfermedades por parásitos. En 2014 se demostró que los miRNAs son determinantes de la fisiología y la fisiopatología del sistema cardiovascular y la expresión alterada de miRNAs específicos como los miR-1, miR-208 y miR-133 en la enfermedad causada por *T. cruzi* involucrando enfermedades cardiovasculares. Trabajos anteriores ha demostrado que la expresión de miRNA está desregulada en la CCC (Navarro et al, 2015; Rodrigues et al, 2014).

En ese mismo año Rodrigues y colaboradores analizaron la expresión de diferentes miRNAs en pacientes con ECh, el hallazgo más importante fue que cinco miRNAs específicos de miocardio, miR-1, miR-133a-2, miR-133b y miR-208 se expresaron significativamente menos en pacientes con CCC. Varios estudios de microarreglos han revelado que miRNAs específicos se expresan de manera aberrante en pacientes con ECh en sus diferentes formas, miR-1, miR-29, miR-133, miR-21, miR-23a, miR-146, entre otros (Rodrigues et al, 2014).

Actualmente, como se ha mencionado existen diversas cepas de *T. cruzi* las cuales varían en el comportamiento de la infección, es por ello que resulta interesante evaluar la respuesta





que existe de una cepa mexicana como Hueypoxtla. La información con la que se cuenta sobre esta cepa es escasa y los resultados de una alteración en la expresión de miRNA abren las puertas a diversos estudios de su biología molecular. La finalidad de este trabajo es medir la expresión en exosomas de plasma, de los siguientes miRNAs: miR-1, miR-16, miR21, miR146a, miR155, y miR208 en modelo murino.

Anteriormente en el laboratorio donde se lleva a cabo este experimento (INC) se midieron los mismos miRNA en plasma de ratones CD1 y se encontraron algunas diferencias significativas en la expresión de estos en las diferentes fases de la ECh (Datos aún no publicados), sin embargo como se mencionó anteriormente los miRNA exosómicos pueden existir de forma estable en la sangre por más tiempo, por lo que los miRNA exosomales muestran potencial de uso como biomarcadores no invasivos para indicar los diferentes estados de la ECh.

#### **IV. OBJETIVOS**

##### **1.OBJETIVO GENERAL**

Medir la expresión de microRNA en microvesículas extracelulares (exosomas) de plasmas de ratón CD1 infectados con la cepa Hueypoxtla de *Trypanosoma cruzi* en las fases aguda y crónica asintomática para su uso como biomarcadores de la enfermedad de Chagas.

##### **2. OBJETIVOS PARTICULARES**

- Aislar microvesículas extracelulares del plasma de ratones CD1 controles e infectados con la cepa Hueypoxtla de *Trypanosoma cruzi* de fase aguda y crónica.
- Aislar RNA de microvesículas extracelulares de plasma de ratones CD1 controles e infectados con la cepa Hueypoxtla de *Trypanosoma cruzi* de fase aguda y crónica.
- Realizar la síntesis de cDNA y qPCR a los miRNAs: miR-1, miR-16, miR-21, miR-146 a, miR-155 y miR-208.
- Analizar las diferencias de expresión de los miRNAs y determinan si son significativamente relevantes en las dos fases de la enfermedad de Chagas.



## V. METODOLOGÍA

### 1. OBTENCIÓN DE LAS MUESTRAS SANGUÍNEAS DE RATONES

Para este estudio se utilizaron 40 ratones hembras cepa CD1, de 6 a 8 semanas de nacimiento con un peso de 20 a 25 g, distribuidos en 4 grupos de estudio divididos y tratados de la siguiente forma:

- 10 ratones controles para la fase aguda de la ECh, sacrificados a los 21 días postinfección (dpi).
- 10 ratones infectados con *T. cruzi* en la fase aguda de la ECh, inoculados por vía intraperitoneal con 1000 tripomastigotes metacíclicos de la cepa Hueypoxtla de *T. cruzi*, aislado del vector *T. dimidiata* y sacrificados a los 21 días dpi.
- 10 ratones controles para la fase crónica asintomática de la ECh, sacrificados a los 81 días dpi.
- 10 ratones infectados con *T. cruzi* en la fase crónica asintomática de la ECh, inoculados por vía intraperitoneal con 1000 tripomastigotes metacíclicos de la cepa Hueypoxtla de *T. cruzi*, aislado del vector *T. dimidiata* y sacrificados a los 81 días dpi.

Los ratones CD1 fueron proporcionados por el departamento de parasitología de la Escuela Nacional de Ciencias Biológicas del IPN, los cuales fueron manejados bajo las especificaciones técnicas para la producción, cuidado y uso de los animales de laboratorio de la NOM-062-ZOO-1999.

La obtención de sangre total de los 40 ratones se llevó a cabo en el Instituto Nacional de Cardiología, mediante la técnica de punción cardíaca y posteriormente se sacrificaron los 40 ratones por administración de pentobarbital (1mL/kg), los residuos se desecharon de acuerdo a la NOM-087-ECOL-1995.



## 2. EXTRACCIÓN DE miRNAs

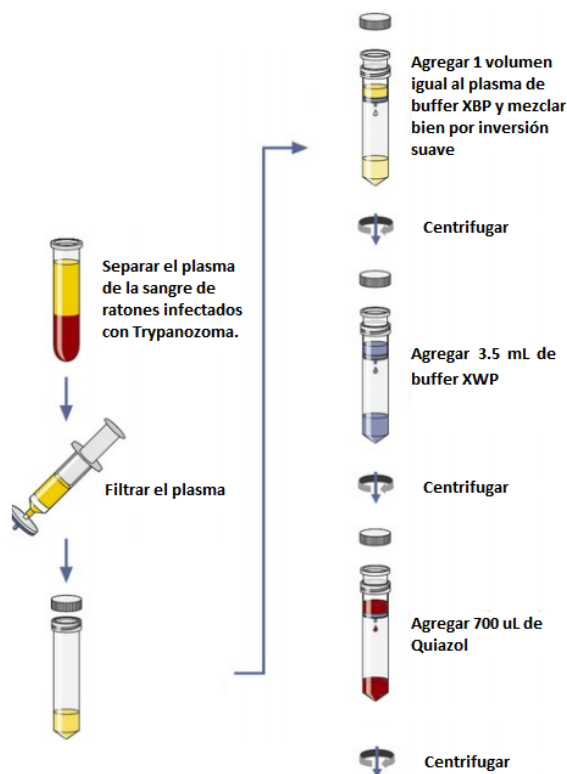
Las muestras sanguíneas de los 40 ratones, se centrifugaron a 13,000 rpm por 30 minutos, para obtener el plasma sanguíneo, el cual se conservó a  $-70^{\circ}\text{C}$ .

Las muestras de plasma se descongelaron y se realizaron 12 pools para el tratamiento de las muestras de acuerdo a la siguiente tabla:

FASE	GRUPO	# MUESTRAS PLASMATICAS
Aguda	Control	3
Aguda	Control	3
Aguda	Control	4
Aguda	Infectado	3
Aguda	Infectado	3
Aguda	Infectado	4
Crónica	Control	3
Crónica	Control	3
Crónica	Control	4
Crónica	Infectado	3
Crónica	Infectado	3
Crónica	Infectado	4
<b>TOTAL</b>		<b>40</b>

Y los grupos de muestras se trataron con el kit “*exoRNeasy serum/plasma Midi Kit*” para la extracción de exosomas.

Se comenzó filtrando el plasma empleando filtros de .8mm y se centrifugó 500 uL de las muestras a 13,000 rpm por 15 min a  $4^{\circ}\text{C}$ . Posteriormente se agregó 500 uL de buffer XBP mezclando por inversión suave, las mezclas se colocaron dentro de la columna de centrifugación exoEasy y se centrifugó a 2,500 rpm durante 1 minuto a temperatura ambiente para remover el buffer de la columna. Se desechó el filtrado y se agregaron 3.5 mL de buffer XWP para centrifugar a 4,000 rpm por 8 minutos a temperatura ambiente. Finalmente se transfirió la columna a un nuevo tubo de recolección y se agregaban 700 uL de Qiazol a la columna y se centrifugó a 4,000 rpm por 8 minutos para coleccionar el lisado. La metodología descrita se resume en el siguiente diagrama



**Figura 12: Metodología ilustrada de la extracción de microvesículas extracelulares de plasma sanguíneo. Adaptada de QIAGEN, 2015.**

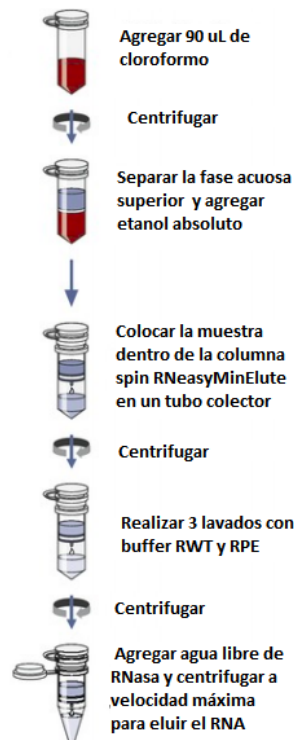
Una vez que se tuvo la fracción exosomal de las muestras se procedió al aislamiento de miRNA con el kit "*exoRNeasyserum/plasma Maxi and Midi Kit*" para miRNA. Se colocaron los tubos que contenían la fracción exosomal brevemente en el vórtex y se incubaron a temperatura ambiente durante 5 minutos.

Se utilizó un control interno de normalización para el perfil de expresión de miRNA añadiendo un miRNA sintético que nos ayudó para el control de la recuperación de RNA y la eficacia de la transcripción reversa. El miR-39 provenía de *C. elegans*, su nombre comercial es *Spike control In miRNeasyserum/plasma*, con una concentración de  $(1.6 \times 10^8)$  copias) y se añadió 3.5 uL a cada una de las muestras.

Posteriormente se agregó 90 uL de cloroformo y se mezcló vigorosamente con vórtex durante 15 segundos, se incubó a temperatura ambiente de 2 a 3 minutos y se separó en fases acuosas y orgánicas por centrifugación a 13000 rpm durante 15 minutos a 4° C. Ya que



contamos con dichas fases se procedió a la recuperación de RNA encontrado en la fase acuosa superior, se transfirió a un nuevo tubo eppendorff. Se midió el volumen total recuperado para después agregar dos volúmenes de etanol absoluto dentro de la columna spin RNeasyMinElute y se centrifugó a 10000 rpm por 1 minuto, se descartó el remanente del tubo colector, posteriormente se agregó 700 uL de buffer RWT a la columna RNeasyMinElute y se centrifugó nuevamente a 10000 rpm durante 1 minuto, se volvió a descartar el remanente del tubo colector y se añadió 500 uL de buffer RPE dentro de la columna RNeasyMinElute, se centrifugó a 10000 rpm durante 2 minutos, se descartó el remanente y se secó la membrana de la columna a 13000 rpm por 5 minutos y para eluir el RNA se agregó 14 uL de agua libre de RNAsa dentro de la membrana de la columna, se dejó reposar durante 1 minuto y se centrifugó a 13000 rpm durante 1 minuto. Las muestras se conservaron a  $-70^{\circ}$  C. La metodología descrita se resume en el siguiente diagrama:



**Figura 13: Metodología ilustrada de la extracción de microRNA a partir de microvesículas extracelulares de plasma sanguíneo. Adaptada de QIAGEN, 2015.**



### 3. CUANTIFICACIÓN DE miRNAs

Los miRNAs se retrotranscribieron empleando 8 primers específicos para cada una de las formas maduras de los siguientes microRNA: miR-1, miR-16, miR-21, miR-39, miR-146a, miR-155 y miR-208; empleando el kit *TaqMan microRNA RT*, se realizó una mezcla de reacción que consistió de los siguientes reactivos:

<b>Reactivo</b>	<b>Volumen</b>	<b>Concentración</b>
dNTP's	0.12 uL	1X
Enzima RTranscriptasa	0.8 uL	1X
Buffer	1.2 uL	1X
Inhibidores de RNAsa	0.15 uL	1X
Primer de cada miRNA	0.6 uL	1X
RNA de cada muestra	1 uL	

Posteriormente se incubaron en un termociclador (Applied Biosystems) durante 3 ciclos; 1<sup>er</sup> ciclo de 30 minutos a 16° C, 2<sup>do</sup> ciclo de 30 minutos a 42° C, 3<sup>er</sup> ciclo de 5 minutos a 85° C y finalmente se mantuvieron a 4° C.

La cuantificación de miRNA se realizó por PCR en tiempo real (qPCR), el kit que se empleó fue “*TaqMan® microRNA assays*” el cual utiliza una sonda que tiene unido un fotocromo reportero y un fotocromo desactivador, con el sistema de placas *TaqMan Custom Arrays*, siguiendo la siguiente tabla de reactivos:

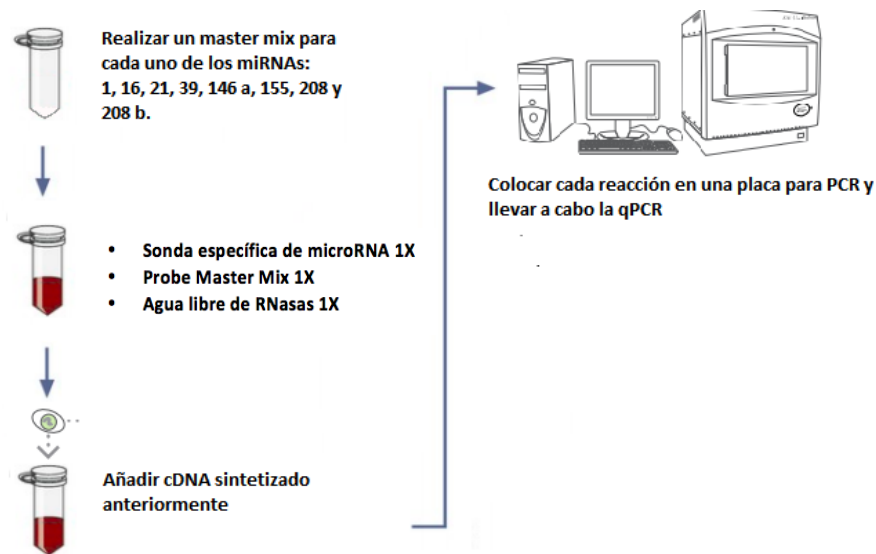
<b>Reactivo</b>	<b>Volumen</b>	<b>Concentración</b>
ProbeMaster Mix	5 uL	1X
Sonda específica	0.5 uL	1X
Agua libre de RNAsas	2.5 uL	1X
Inhibidores de RNAsa	0.15 uL	1X
cDNA	2 uL	

Se utilizó un equipo LightCycler para la qPCR. Donde se monitoreó la señal fluorescente del reportero en los sucesivos ciclos, hasta que se observó un ciclo umbral (Ct) en la fase exponencial de amplificación. La cuantificación de los niveles de expresión relativa se realizó usando curvas estándar para los miR y el control endógeno (miR-39).



La expresión de los miRNAs se calculó por el método comparativo de Ct ( $2^{-\Delta Ct}$ ) para calcular los cambios de expresión génica:  $2^{-(Ct \text{ miR} - Ct \text{ miR referencia})}$ .

La metodología descrita se resume en el siguiente diagrama:



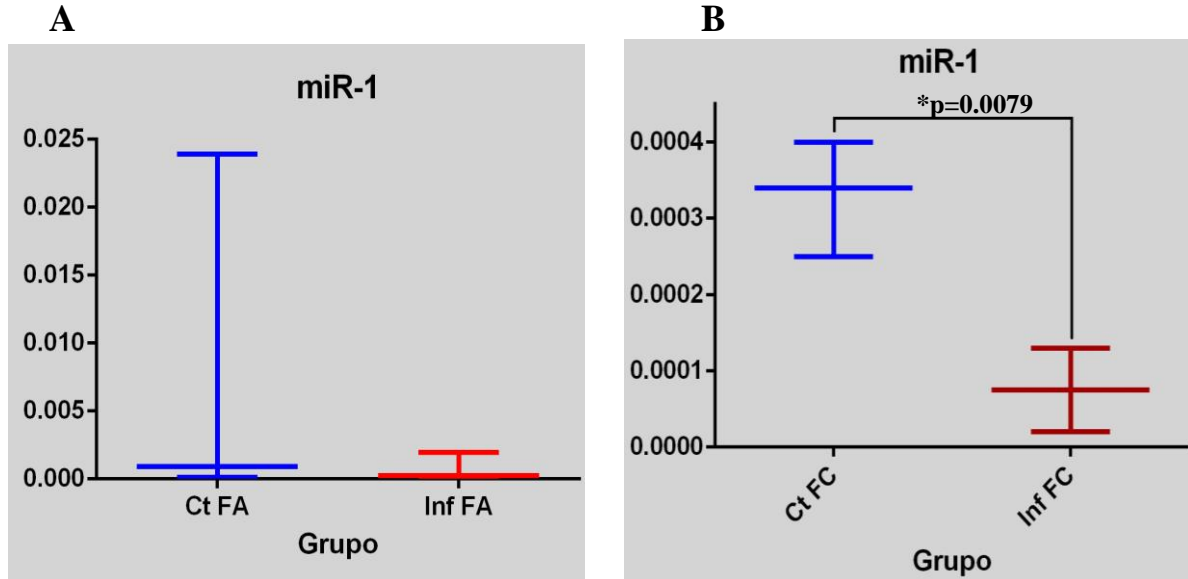
**Figura 14: Metodología ilustrada de la qPCR. Adaptada de QIAGEN, 2015.**

#### 4. ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Finalmente los resultados se graficaron con ayuda del programa GraphPad Prism versión 6 comparando la expresión de cada uno de los miRNAs con el miR-39 de cada una de las fases. Y posteriormente los grupos de cada fase de los miRNAs se compararon mediante una prueba no paramétrica (prueba de suma de rangos de Mann-Whitney) con el software GraphPad Prism versión 6. Los resultados se expresaron como medianas, y los valores de P se consideraron significativos si  $P < 0.05$ .



## VI. RESULTADOS

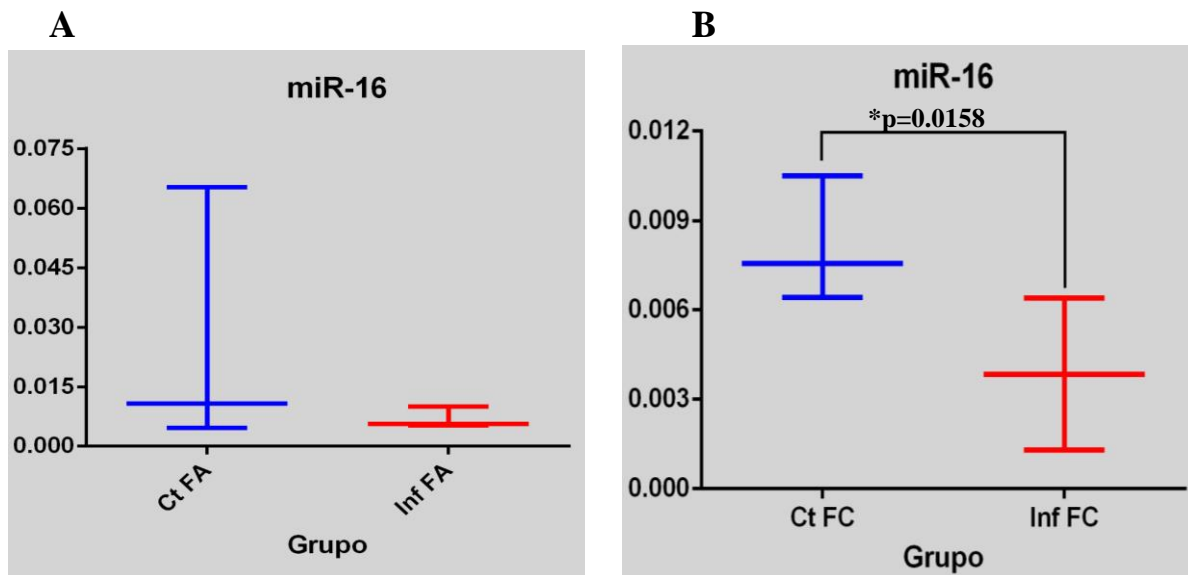


**Figura 15:** Comparación de la expresión de miR-1 en fase aguda y crónica contra los controles de cada una de las fases.

CtFA: Controles fase aguda; InfFA: Infectados fase aguda; CtFC: Controles fase crónica; InfFC: Infectados fase crónica.

**A.** Comparación de la expresión del miR-1 en FA contra su control.

**B.** Comparación de la expresión del miR-1 en FC contra su control.



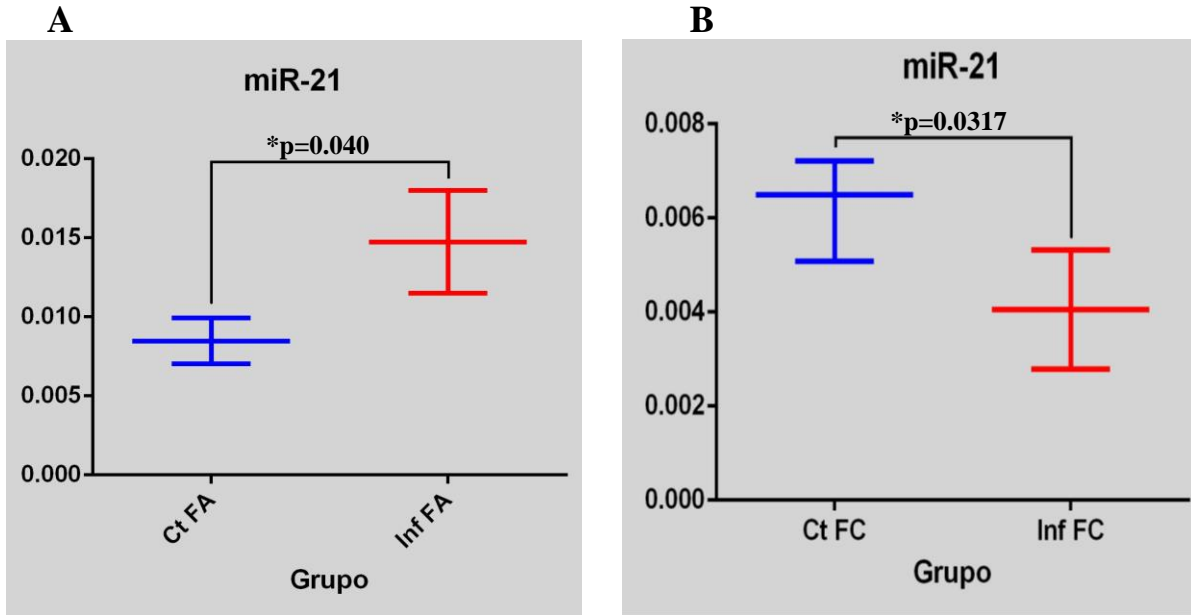
**Figura 16:** Comparación de la expresión de miR-16 en fase aguda y crónica contra los controles de cada una de las fases.

CtFA: Controles fase aguda; InfFA: Infectados fase aguda; CtFC: Controles fase crónica; InfFC: Infectados fase crónica.

**A.** Comparación de la expresión del miR-16 en FA contra su control.

**B.** Comparación de la expresión del miR-16 en FC contra su control.



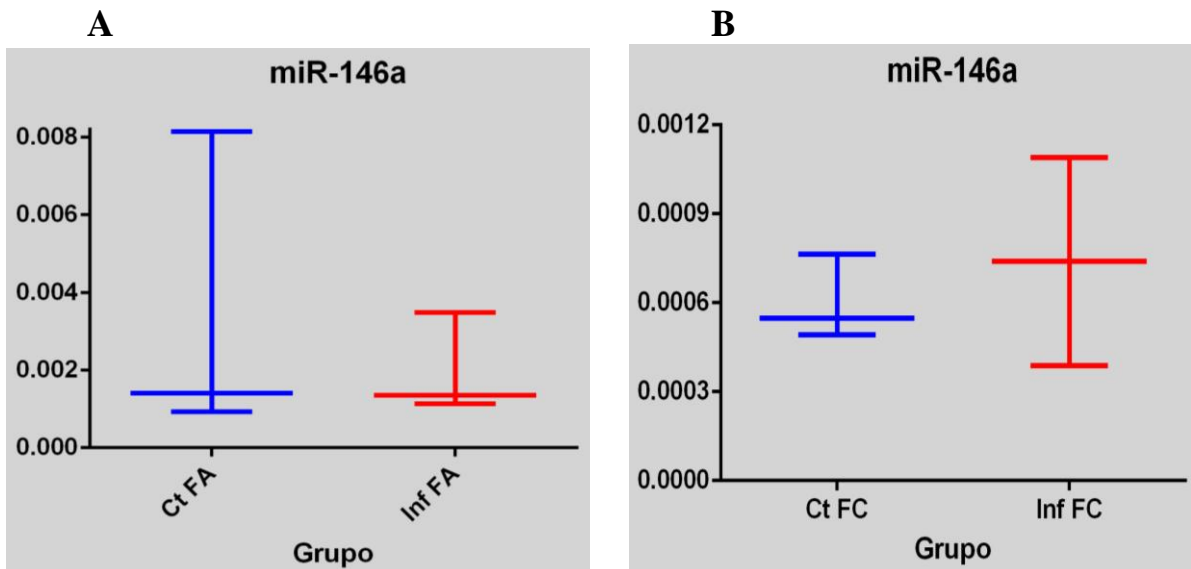


**Figura 17: Comparación de la expresión de miR-21 en fase aguda y crónica contra los controles de cada una de las fases.**

CtFA: Controles fase aguda; InfFA: Infectados fase aguda; CtFC: Controles fase crónica; InfFC: Infectados fase crónica.

**A.** Comparación de la expresión del miR-21 en FA contra su control.

**B.** Comparación de la expresión del miR-21 en FC contra su control.

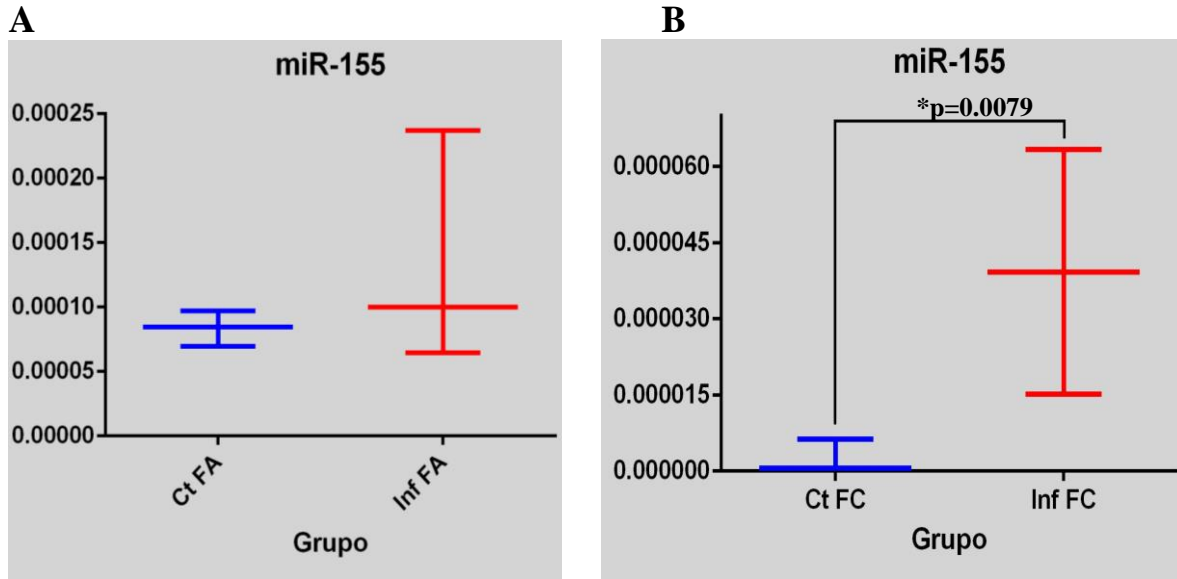


**Figura 18: Comparación de la expresión de miR-146a en fase aguda y crónica contra los controles de cada una de las fases.**

CtFA: Controles fase aguda; InfFA: Infectados fase aguda; CtFC: Controles fase crónica; InfFC: Infectados fase crónica.

**A.** Comparación de la expresión del miR-146a en FA contra su control.

**B.** Comparación de la expresión del miR-146a en FC contra su control.

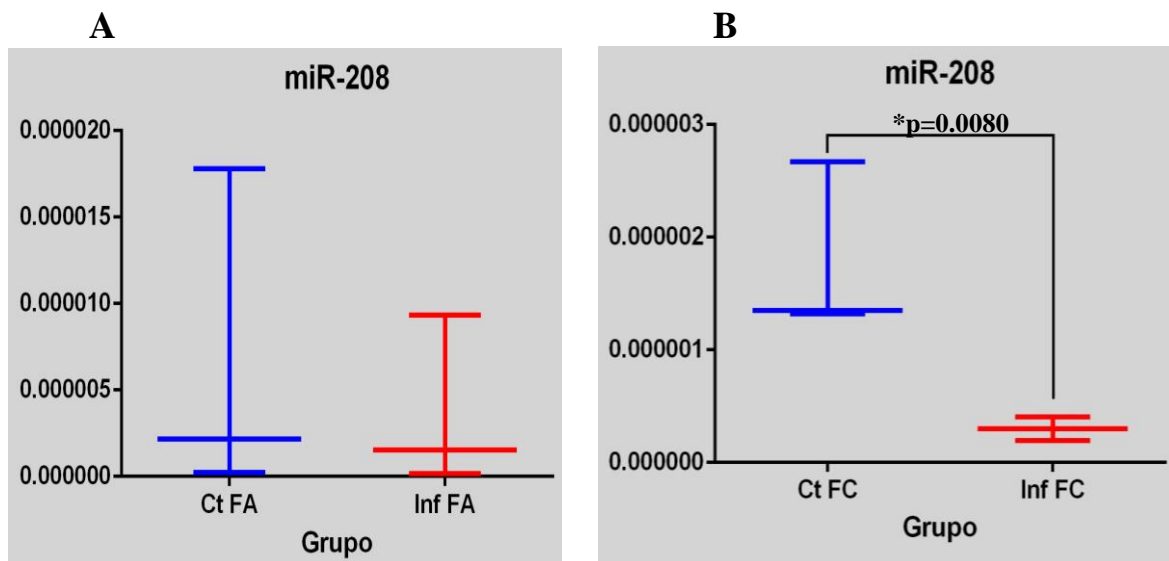


**Figura 19: Comparación de la expresión de miR-155 en fase aguda y crónica contra los controles de cada una de las fases.**

CtFA: Controles fase aguda; InfFA: Infectados fase aguda; CtFC: Controles fase crónica; InfFC: Infectados fase crónica.

**A.** Comparación de la expresión del miR-155 en FA contra su control.

**B.** Comparación de la expresión del miR-155 en FC contra su control.



**Figura 20: Comparación de la expresión de miR-208 en fase aguda y crónica contra los controles de cada una de las fases.**

CtFA: Controles fase aguda; InfFA: Infectados fase aguda; CtFC: Controles fase crónica; InfFC: Infectados fase crónica.

**A.** Comparación de la expresión del miR-208 en FA contra su control.

**B.** Comparación de la expresión del miR-208 en FC contra su control.



## VII. DISCUSIÓN

La naturaleza de las lesiones de la enfermedad de Chagas inducidas por el parasitismo están intrínsecamente relacionadas con la perpetuación del parásito en los tejidos afectados (Linhares et al, 2018) En este sentido, en este trabajo se estudió la modulación de posibles biomarcadores de miRNAs en la ECh en fase aguda y crónica para ser utilizados en el diagnóstico de dicha enfermedad. Nuestro trabajo incluye análisis de expresión de miRNAs que han sido previamente reportados en inflamación y en enfermedades cardiovasculares en plasma, sin embargo no se ha explorado su expresión en exosomas y son pocos los trabajos que los involucran en la ECh, incluimos también su comparación con un miRNA endógeno control comparando los resultados de fase aguda y fase crónica en un modelo murino realizando un análisis estadístico para perfilar la expresión exosómica de dichos miRNAs como nuevos biomarcadores.

Hasta el momento, parece haber alrededor de 200 miRNAs expresados en el sistema cardiovascular. Muchos de esos miRNAs son regulados en respuesta al estrés cardíaco durante la respuesta compensatoria del corazón a una lesión crónica. Existen evidencias crecientes de que la expresión de miRNAs es una parte importante del mecanismo de respuesta al estrés agudo del corazón (Oliveira, et al, 2012). De los siete miRNA estudiados en este trabajo, hay cinco miRNAs que se expresa altamente o específicamente en miocardiocitos; miR-1, miR-16, miR-21 y miR-208, mientras que miR-146 y miR-155 son encontrados en diversos procesos de inflamación.

En las enfermedades cardiovasculares, los miRNAs son reguladores cruciales de la función cardíaca. Aunque los mecanismos moleculares subyacentes a la expresión génica del miocardio no están bien esclarecidos, estudios han demostrado que los miRNAs involucrados en el proceso de regulación del desarrollo cardíaco y trastornos cardiovasculares tienen su expresión desregulada en formas avanzadas de enfermedad cardíaca crónica chagásica (Linhares et al, 2018)

En el músculo esquelético, el miR-1 forma parte de un conjunto de miRNAs referidos como miomiRs (Oliveira, et al, 2012).



El miR-1 está altamente expresado en el músculo esquelético y en el corazón, es inducido durante la diferenciación del músculo, y desempeñan un papel crítico en la regulación de ese proceso, como se puede observar en la Figura 15 B, la expresión de miR-1 en la fase crónica de la ECh tuvo una disminución significativa con un  $p=0.0079 < 0.05$ , atribuyendo esta disminución al daño que ejerce el parásito *T. cruzi* en los cardiomiocitos, ya que, es en esta fase de la enfermedad donde se desarrolla la CCC, en comparación a la fase aguda de la enfermedad, donde no se encontró diferencia significativa ya que el parásito se encuentra circulante en sangre y no ha invadido el tejido cardíaco aún.

miR-1 tienen una expresión alterada en pacientes con miocardiopatía hipertrófica y dilatación auricular así como en diferentes modelos murinos de hipertrofia cardíaca.

En el 2014 un grupo de investigadores demostraron que los niveles de expresión de miR-1 en plasma disminuyen en pacientes con CCC, también demostraron que este miRNA interacciona con NF- $\kappa$ B y proteínas cinasas, fosfatidilinositol 3-cinasas (PI3K) y la proteína Cínasa B (akt), enzimas que desempeñan un papel importante en la señalización de vías que conducen a la hipertrofia cardíaca. Aunque los estudios han demostrado que la activación aguda de Akt es cardioprotectora *in vitro* e *in vivo* debido a su capacidad para inhibir la apoptosis, sin embargo la activación crónica de Akt en el corazón ha demostrado ser perjudicial (Rodrigues et al, 2014).

Por otro lado en 2012 se encontró que la activación de Akt regula negativamente la expresión de miR-1 *in vitro* e *in vivo* en corazones enfermos, mediante la fosforilación del factor de transcripción, caja O3 de Forkhead (FoxO3a) que se une al promotor miR-1 y es responsable de una disminución de la expresión de miR-1 observada en corazones con insuficiencia crónica (Kumarswamy et al, 2012), lo que resulta evidente tras la disminución significativa de la expresión de este microRNA únicamente en los ratones que se encontraban en fase crónica tras la activación prolongada de Akt inhibiendo la expresión de miR-1 en el músculo esquelético y por lo tanto siendo este un posible biomarcador ya que al medirlo contra un control se encontrarán niveles disminuidos de este miRNA empaquetado en exosomas debido a la inhibición de la maduración de este.



miR-16 se ha descrito en más de una decena de artículos relacionados a la leucemia linfocítica crónica (LLC), que se caracteriza por células B malignas predominantemente nondividas que sobreexpresan la proteína antiapoptótica del linfoma B2 (Bcl-2). Sin embargo, son escasos los estudios que tratan a Bcl-2 en patologías cardíacas y hasta la fecha no existen proyectos en lo que se estudie el miR-16 en afectaciones cardíacas.

En 2015 un grupo de investigadores demostraron que la expresión de miR-16 se correlaciona inversamente con la expresión de Bcl-2 y que este microRNA regula negativamente Bcl-2 en un nivel postranscripcional y la represión de Bcl-2 por este microRNA induce apoptosis en varios modelos celulares de leucemia (Cimmino et al, 2015).

Como se observa en la Figura 16 B, la expresión del miR-16 en la fase crónica mostró una diferencia significativa, disminuyendo su expresión, con un  $p = 0.0158 < 0.05$ ; debido a que en la fase crónica el *T. cruzi* invade diversas células, el parásito debe ejercer diversos mecanismos para evadir el sistema inmune y la apoptosis de las células dañadas. Uno de los mecanismos que realiza *T. cruzi* para evitar la muerte de las células durante su invasión, consiste en regular positivamente la expresión de proteínas antiapoptóticas de la familia Bcl-2. La regulación del factor neurotrópico derivado del parásito (PDNF) realiza una unión a receptores Tirosin Kinasa (Trk), lo cual activa vías de señalización que resultan en la fosforilación de CREB y la regulación positiva del gen B-2 antiapoptótico (Nagajyothi et al, 2012).

En 2004 se encontró niveles significativamente elevados de cuatro de los miembros de la familia Bcl-2 en pacientes con cardiomiopatía dilatada (CD) y corazón isquémico (CI) en comparación con muestras de donantes sanos (Latif et al, 2000).

En la ECh se encuentran la CD y CI dentro de las afectaciones más comunes que sufre el paciente en la fase crónica, las cuales tienen una relación directa con las proteínas Bcl-2 reportadas como parte de un mecanismo de supervivencia de *T. cruzi* en el hospedero. Por ello no es sorprendente que debido a su interacción antisentido miR-16 se encuentre



disminuido en comparación con un control sano, tal como lo demuestran los resultados. Se ha descrito que al encontrarse miR-16 elevado existe una disminución de la traducción de proteínas Bcl-2, lo cual sugiere que una inducción de la expresión de este miRNA en células invadidas por *T. cruzi* podría ayudar a la disminución del parasitismo por la apoptosis específica de estas células, limitando la reproducción de amastigotes y la invasión a más células sanas. El enfoque en este miRNA durante la ECh debe desarrollarse ya que los resultados obtenidos apuntan a miR-16 como un buen biomarcador para el diagnóstico del desarrollo de lesiones cardíacas por *T. cruzi*.

Otro miRNA alterado por estrés cardíaco es miR-21, cuyo papel está vagamente definido. Este miRNA es inducido por el estrés y es un regulador del crecimiento cardíaco (Chaitra et al, 2013). Como podemos observar en la Figura 17, miR-21 fue el único miRNA que mostró diferencias significativas de expresión en ambas fases de la ECh.

miR-21 es muy estudiado en cáncer debido a que es de los pocos microRNAs que se llegan a expresar muy por arriba de lo normal, llegando a encontrarse hasta cinco veces por arriba de lo normal, además de encontrarse en más de 4 tipos de cánceres. Curiosamente, los altos niveles de miR-21 no solo se encuentran en diversos cánceres, sino que también representan una característica común del crecimiento celular patológico o estrés celular. Por ejemplo, miR-21 está regulado positivamente en varios modelos de corazón hipertrófico de ratón (Krichevsky & Gabriely, 2009).

Como podemos observar en la Figura 17 A, la expresión de miR-21 en los ratones en fase aguda mostró diferencia significativa, aumentando su expresión, con un  $p = 0.0400 < 0.05$ . El aumento de este microRNA se ha encontrado directamente relacionado en la fibrosis cardíaca. Se ha demostrado que promueve la supervivencia de fibroblastos, la secreción del factor de crecimiento y la síntesis de colágenos a través de la regulación de la proteína cinasa activada por cinasa - mitógeno (Cavarretta & Condorelli, 2015).

En 2012, Liang su grupo de trabajo demostró que durante el estrés del corazón miR-21 activa la ruta de factor de crecimiento transformante beta (TGF- $\beta$ ) / Smad a través de la supresión del receptor III de TGF- $\beta$  en el tejido cardíaco, generando un ciclo que aumenta la



expresión de miR-21, produciendo una alterada producción de colágeno, así como de la expresión de  $\alpha$ -actina de músculo liso ( $\alpha$ -SMA) y facilitación de la diferenciación de fibroblastos en miofibroblastos patológicos, promoviendo la fibrosis (Cavarretta & Condorelli, 2015).

De acuerdo a lo descrito por Liang, el aumento de la expresión de miR-21 en la fase aguda puede deberse al estrés producido por arritmias, taquicardias e infartos; entre las manifestaciones que ocurren durante la ECh en la fase aguda se encuentran taquicardias, alteración de la repolarización ventricular, arritmias ventriculares y fibrilación atrial (Andrade et al, 2011), situaciones que pueden causar el desencadenamiento de una sobreexpresión de miR-21, lo cual también da parte de la explicación del mecanismo mediante el cual se produce la fibrosis tan comúnmente encontrada durante la ECh en la fase crónica, ya que tras el estrés constante al miocardio y la expresión desregulada de miR-21 la fibrosis que encontraremos en esta fase estará avanzada.

El papel de los miRNAs, y en particular de miR-21, en la fibrosis cardíaca se está desentrañando cada vez más, lo cual podría ayudar al diagnóstico oportuno del desarrollo de fibrosis desde fases tempranas y que esta no evolucione, así como el desarrollo de terapias anti-miRNA destinadas a detener la fibrosis al inicio o durante la progresión de ésta.

Durante la fase crónica la expresión de miR-21 también tuvo una diferencia significativa con su control endógeno, como podemos observar en la Figura 17 B, la expresión de miR-21 en los ratones en fase crónica mostró una disminución significativa, con un  $p=0.0317 < 0.05$ . La disminución de este miRNA no ha sido reportada aún asociada a ningún tipo de patología, sin embargo se han reportado patrones inesperados de expresión de miR-21 en líneas celulares que expresan niveles bajos o indetectables de dicho miRNA durante la diferenciación celular (Krichevsky & Gabriely, 2009). Esto sugiere que miR-21 es fundamental para equilibrar la proliferación celular y la diferenciación y que los niveles relativamente bajos de miR-21 pueden ser temporales y espacialmente necesarios para la diferenciación y el desarrollo, mientras que los niveles altos pueden tener un potencial patogénico (Krichevsky & Gabriely, 2009).



Por lo tanto, la cuestión central planteada por numerosos estudios descritos anteriormente es cómo se regula la expresión de miR-21 y cuáles son los mecanismos que conducen a su desregulación en diversas patologías humanas ya que la expresión de este miRNA es muy evidente en diversas enfermedades, incluyendo la ECh tanto en fase aguda como en crónica; sin embargo su regulación aún no ha sido completamente descrita.

La CCC es uno de los padecimientos más comunes entre los pacientes que padecen esta enfermedad ya que alrededor de un 30% de estos la desarrollan (Jörg et al, 2002). Sin embargo el mecanismo exacto del desarrollo de esta patogénesis aún se encuentra en debate (León et al, 2003). Un mecanismo propuesto es que la CCC es una enfermedad autoinmune inducida por *T. cruzi*, ya que se postula que *T. cruzi* induce respuestas autoinmunes en el huésped, y estas causan daño tisular e inflamación (Leon et al, 2003).

En el 2013, se describió que miR-146a promueve la lesión endotelial del miocardio de forma paracrina a través de los exosomas endoteliales (Halkein et al, 2013).

Debido a que miR-146a se encuentra reportado en inflamación (Curtale et al, 2009), así como en la lesión del miocardio a través de exosomas, se incluyó en este estudio con el propósito de encontrarlo como un posible biomarcador del desarrollo de CCC, sin embargo no se encontró una diferencia significativa en su expresión en ninguna de las fases de la ECh, por lo que los cambios de expresión de este miRNA no reportan datos que ayuden en el diagnóstico de esta enfermedad. Como respaldo a este resultado, en 2014, Rodrigues y colaboradores analizaron en plasma de humanos nueve miRNAs que podrían estar desregulados en la ECh en grupos de pacientes con CCC y CD donde incluyeron el miR-146a; sin embargo, este miRNA no mostró expresión significativamente alterada en ninguno de los grupos (Rodrigues et al, 2014), por lo que este miRNA se encuentra completamente descartado como un posible biomarcador de la ECh.

Aunque miR-155 se descubrió en niños con linfoma de Burkitt (Kluiver, et al, 2007) y está asociado con diferentes cánceres, se han generado evidencias que sugieren a este miRNA como un miRNA multifuncional que regula múltiples vías en la diferenciación del linaje hematopoyético, inmunidad, inflamación, infecciones y enfermedades cardiovasculares.





Durante la fase crónica la expresión de miR-155 tuvo diferencia significativa comparándola con su control endógeno, como podemos observar en la Figura 19 B. La expresión de este miRNA en ratones que se encontraban en fase crónica mostró un aumento significativo, con un  $p=0.0079 < 0.05$ ; lo que demuestra que durante la fase crónica *T. cruzi* es capaz de activar procesos inflamatorios que aumentan la expresión de este miRNA ya que el miR-155 se encuentra involucrado en inflamación durante estrés cardiaco, causando lisis celular. En 2017 un estudio demostró que la expresión de miR-155 aumenta significativamente en corazón de ratón después de un infarto agudo de miocardio (IAM), mostrando su expresión más altas en macrófagos y fibroblastos cardíacos respectivamente, sin embargo, la expresión de pri-miR-155 únicamente se encontró en macrófagos, lo cual apunta a que miR-155 se produce en macrófagos y se transfiere a fibroblastos cardíacos. También observaron que la expresión de miR-155 se eleva en respuesta a Angiotensina II (Wang et al, 2017).

Wang y su equipo demostraron que los exosomas de macrófagos que contienen miR-155 son capaces de suprimir la proliferación de fibroblastos regulando negativamente la expresión de la proteína *Sos1* e incrementando la inflamación de fibroblastos al disminuir la expresión de *Socs1* (Wang et al, 2017). Esto apoya la hipótesis de que un posible mecanismo de lisis celular de *T. cruzi* para la liberación de amastigotes del tejido cardiaco es la activación del empaquetamiento de miR-155 de macrófagos en exosomas para facilitar la lisis celular por inflamación del tejido.

En 2017 Cao y su equipo demostró que miR-155 se expresa alrededor de 3 veces más en suero de pacientes con aneurismas en comparación con los controles. En este trabajo se encontró que miR-155 se expresa alrededor de 10 veces más en exosomas utilizando plasma de ratones, un dato que demuestra que el aumento en la expresión en exosomas puede ser de mayor utilidad para el diagnóstico de daño al miocardio causado por aneurismas e incluso durante la formación de los mismos en la ECh. Este resultado también señala que los exosomas podrían ser los responsables de mediar la interferencia entre la carga del miRNA de los macrófagos a los fibroblastos (Cao et al, 2016).

La formación de aneurismas aórticos es una manifestación de la fase crónica de la ECh con implicaciones potencialmente mortales. Ensayos han demostrado que miR-155 puede



unirse directamente a la región 3' UTR del receptor de angiotensina II tipo 1 (AGTR1), el cual se encuentra asociado a la formación de aneurismas (Wang et al, 2017).

Un estudio realizado en el 2000 demostró que el aumento de AGTR1 se encontraba relacionado con la fibrosis cardiaca, otro de los signos frecuentes encontrados durante la fase crónica de la ECh; en el mismo estudio demostraron que el bloqueo de AGTR1 atenuaba la fibrosis y reducía la expresión de colágeno 1 $\alpha$  (I) y TGF- $\beta$ 1 en corazón de ratón (Lim et al, 2000). La expresión de AGTR1 está regulada predominantemente por mecanismos postranscripcionales. Estudios han demostrado que miR-155 reduce la expresión endógena de AGTR1 (Faraoni et al, 2009).

*T. cruzi* desregula la respuesta inmune mediante diversos mecanismos, entre los que incluye la desregulación de la enzima convertidora de angiotensina (Scharfstein et al, 2008), la cual convierte angiotensina I en angiotensina II.

Todos estos datos sugieren que si *T. cruzi* altera la regulación de AGTR1, el hospedero debe activar una respuesta para bloquear la traducción de la proteína AGTR1 y ésta no provoque daño al tejido cardiaco aumentando la expresión de miR-155, el cual se empaqueta desde macrófagos en exosomas y a largo plazo este miRNA sea utilizado por *T. cruzi* como un mecanismo de lisis celular.

miR-208 es uno de los miRNAs más importantes en el corazón, el cual se encuentra dentro del grupo de los miomiRs, cuya expresión se altera de manera constante en corazones hipertróficos de humanos y roedores, por lo que se le ha considerado como un biomarcador potencial de lesiones cardiacas (Rooij & Olson, 2007).

Los productos génicos de la cadena pesada de miosina son un determinante importante de las propiedades funcionales del miocardio. La cadena pesada de la  $\beta$ -miosina ( $\beta$ MHC) es la isoforma de miosina predominante expresada en el corazón prenatalmente mientras que la cadena pesada de la  $\alpha$ -miosina ( $\alpha$ MHC) está regulada positivamente después del nacimiento. Al igual que  $\alpha$ MHC, miR-208 se expresa específicamente en el corazón, el cual se procesa a partir del pre- mRNA de  $\alpha$ MHC (Wang et al, 2013).



miR-208 se expresan durante el desarrollo cardíaco y diversas patologías cardíacas. Se sabe que la sobreexpresión de miR-208 es suficiente para inducir hipertrofia cardíaca asociada a la expresión de  $\beta$ MHC, inducida por miR-208, lo que se asocia también al desarrollo de fibrosis cardíaca, lo cual ha sido reportado por diversas investigaciones en ratones y pacientes donde se reporta el aumento de miR-208 (Rooij et al, 2009; Cunha et al, 2005; Callis et al, 2009).

Curiosamente existen reportes acerca de la regulación negativa de miR-208 en la CCC en tejido cardíaco y plasma de pacientes y ratones infectados con *T. cruzi* (Navarro et al, 2015; Rodrigues et al, 2014).

Como podemos observar en la Figura 20 B, la expresión de miR-208 en los ratones que se encontraban en fase crónica mostró una disminución significativa, con un  $p=0.0080 < 0.05$ , este resultado demuestra una variación constante de este miRNA en la ECh ya que aunque durante la fase crónica se desarrolla daño cardíaco, la expresión del miR-208 se comporta de manera contraria a los reportes de enfermedades cardíacas no causadas por *T. cruzi*, sin embargo, el mecanismo por el que existen estas variaciones de miR-208 aún no se reporta.

Por otro lado, un estudio realizado en el 2015 demostró que medir la expresión de miR-208 en exosomas fue significativamente más sensible que la que suele hacerse en suero de pacientes con síndrome coronario agudo (Bi et al, 2015), determinando que la detección de marcadores moleculares en exosomas es superior a la del suero cuando se trata de encontrar moléculas de poca estabilidad o de baja abundancia como los miRNAs.

Es notable que el daño cardíaco provocado por *T. cruzi* inhibe la expresión de miR-208, mostrando un gran potencial para usar como biomarcador en exosomas durante la enfermedad cardíaca causada específicamente por *T. cruzi* ya que durante la fase crónica donde los pacientes desarrollan lesiones cardíacas podría diferenciarse si se trata o no de una lesión causada por *T. cruzi* ya que de ser causada por este parásito la expresión de este miRNA se encontrará disminuida, contrario a lo que se encontraría por lesiones cardíacas no causadas por este parásito.



## VIII. CONCLUSIONES

De acuerdo a los resultados obtenidos de la medición de la expresión en fase crónica de los miR-1, miR-16, miR-155 y miR-208 en vesículas extracelulares de ratones CD1 infectados con *T. cruzi* cepa Hueypoxtla mostró cambios significativos de expresión, lo cual, los convierte en candidatos para su uso como biomarcadores durante el desarrollo de lesiones cardíacas durante esta enfermedad.

El miR-21 fue el único miRNA que mostró diferencia significativa durante ambas fases de la ECh, convirtiéndolo en un biomarcador potencial para el diagnóstico temprano de la ECh provocada por *T. cruzi* cepa Hueypoxtla, y como referencia para la fase en la que el paciente se encuentre de la enfermedad.

El uso de miR-146a como biomarcador se descarta ya que no mostró diferencias significativas de expresión en ninguna fase de la ECh.

La infección por una cepa de *T. cruzi* nunca antes reportada sigue los mismo patrones de respuesta de las cepas reportadas en diversos estudios, por lo que es de suponer que Hueypoxtla comparte las mismas vías de señalización de infección sobre el hospedero.

Por último, los miRNAs empleados para este trabajo juegan un papel importante en el desarrollo de la ECh, principalmente durante el desarrollo de lesiones cardíacas, pero la información disponible en este contexto aún no es suficiente. Se necesitan más estudios para identificar otros miRNAs implicados en esta enfermedad así como la comprensión de su mecanismo ya que este podrá proporcionar información crucial sobre muchos de los misterios de la progresión de la enfermedad, así como las vías por las que el parásito genera lesiones cardiovasculares, y teniendo en cuenta las vías asociadas, las terapias basadas en miRNAs podrían allanar el camino para el tratamiento de dichas patologías cardíacas.



## IX. REFERENCIAS

1. Andrade, J. Marin, N. Paola, A. Vilas-Boas, F. Moraes, G. Bacal, F. Alcides, E. Rodrigues, D. Fragata, A. Vieira, M. Salles, S. Oliveira, W. Dias, J. (2011). I Directriz latinoamericana para el diagnóstico y tratamiento de la cardiopatía chagásica: resumen ejecutivo. *Arquivos Brasileiros de Cardiologia*, 96(6): 434-442.
2. Apt, W. (2013). *Parasitología Humana*. México. McGraw-Hill Interamericana Editores S.A. de C.V.
3. Beach, A. Zhang, H. Ratajczak, M. Kakar, S. (2014). Exosomes: an overview of biogenesis, composition and role in ovarian cancer. *Journal of Ovarian Research*, 14(7): 1-10.
4. Becerril, A. (2014). *Parasitología médica*, 4a. Ed. México. McGraw-Hill Interamericana Editores S.A. de C.V.
5. Bi, S. Wang, C. Jin, Y. Lv, Z. Xing, X. Lu, Q. (2015). Correlation between serum exosome derived miR-208a and acute coronary syndrome. *International Journal of Clinical and Experimental Medicine*, 8(3), 4275-4280.
6. Brener, Z. (1992) *Trypanosoma cruzi: taxonomy, morphology and life cycle*. Brasil. Sociedad Brasileña de Hematología & Hemoterapia.
7. Callis, T. Pandya, K. Seok, H. Tang, R. Tatsuguchi, M. Huang, Z. Chen, J. Deng, Z. Gunn, B. Shumate, J. Willis, M. Selzman, C. Wang, D. (2009). MicroRNA-208a is a regulator of cardiac hypertrophy and conduction in mice. *The Journal of Clinical Investigation*, 119(9): 2772-2786.
8. Campos, A. Rubio, M. Itandehui. Hernández, L. Martínez, S. Manning, R. (2017). Enfermedad de Chagas: vectores. *Revista ciencia AMC*, 68(1): 30-33.
9. Cao, R. Li, Q. Miao, Y. Zhang, Y. Yuan, W. Fan. Liu, G. Mi, Q. Yang, J. (2016). The Emerging Role of MicroRNA-155 in Cardiovascular Diseases. *BioMed Research International*, 2016 (2016): 9869208.
10. Cavarretta, E & Condorelli, G. (2015). miR-21 and cardiac fibrosis: another brick in the wall?. *European Heart Journal*, 36(32): 2139-2141.
11. CDC. (2016). American Trypanosomiasis (also known as Chagas Disease). *Emerging Infectious Diseases journal*, 61(26): 477-479. Chaitra, K. Ulaganathan, K. James, A. Ananthapur, V. Nallari, P. (2013). miRNA regulation during cardiac development and remodeling in cardiomyopathy. *EXLI Journal*, 13(12): 980-992.
12. Cimmino, A. Calin, G. Fabbri, M. Iorio, M. Ferracin, M. Wojcik, S. Aqeilan, R. Zupo, S. Dono, M. Rassenti, L. Alder, H. Volinia, S. Liu, C. Kipps, T. Negrini, M. Croce, M. (2015). miR-15 and miR-16 induce apoptosis by targeting BCL2. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA*, 102(39): 13944-13949.
13. Cohen, J. Gürtler, R. (2001). Modelling household transmission of American trypanosomiasis. *Science*, 5530(293): 694- 698.



14. Cunha, E. Dzau, V. Allen, P. Stamatiou, D. Benvenuti, L. Higuchi, M. Koyama, N. Silva, J. Kalil, J. Liew, C. (2005). Cardiac Gene Expression Profiling Provides Evidence for Cytokinopathy as a Molecular Mechanism in Chagas' Disease Cardiomyopathy. *American Journal of Pathology*, 167(2): 305-313.
15. Curtale, G. Citarella, F. Carissimi, C. Goldoni, M. Carucci, N. Fulci, V. Franceschini, D. Meloni, F. Barnaba, V. Macino, G. (2009). An emerging player in the adaptive immune response: microRNA-146a is a modulator of IL-2 expression and activation-induced cell death in T lymphocytes. *Blood Journal*, 115(2): 265-273.
16. ExoCarta. Exosome protein, RNA and lipid database. Sitio web: <http://www.exocarta.org>
17. Faraoni, I. Romana, J. Cardone, J. Bonmassar, E. (2009). miR-155 gene: A typical multifunctional microRNA. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1792(6): 497-505.
18. Garza, M. (2015). Situación actual y perspectivas de la enfermedad de Chagas en México y en América Latina. Tesis de especialidad en bioquímica clínica. México. UNAM
19. Gascón, J. Albajar, P. Cañas, E. Flores, M. Gómez, J. Herrera, R. Lafuente, J. Luciardi, H. Moncayo, A. Molina, L. Muñoz, J. Puente, S. Sanz, G. Treviño, B. Salles, X. (2007). Diagnóstico, manejo y tratamiento de la cardiopatía chagásica crónica en áreas donde la infección por *Trypanosoma cruzi* no es endémica. *Revista Española de Cardiología*, 60(3): 285-293.
20. Halkein, J. Tabruyn, S. Ricke-Hoch, M. Haghikia, A. Nguyen, N. Scherr, M. Castermans, K. Malvaux, L. Lambert, V. Thiry, M. Sliwa, K. Noel, A. Martial, J. Hilfiker-Kleiner, D. Struman, I. (2013). MicroRNA-146a is a therapeutic target and biomarker for peripartum cardiomyopathy. *The Journal of Clinical Investigation*, 123(5): 2143-2154.
21. Haruhiko, S. Mikiko, S. (2010). Posttranscriptional Regulation of MicroRNA Biogenesis in Animals. *Cell press*, 38(3): 323-332.
22. Hessvik, N. & Llorente, A. (2018). Current knowledge on exosome biogenesis and release. *Cellular and Molecular Life Sciences*, 75(2), 193-208.
23. James, R. (2016). Q&A: What are exosomes, exactly?. *BMC Biology*, 14(46):1-7.
24. Jörg, M. Storino, M. (2002). La enfermedad de Chagas en el siglo XXI: Consenso para una asignatura pendiente. *Revista Argentina de Cardiología*, 70(1): 69-87.
25. Kluiver, J. Van den Berg, A. Jong, D. Blokzijl, T. Harms, G. Bouwman, E. Jacobs, S. Poppema, S. Kroesen, B. (2007). Regulation of pri-microRNA BIC transcription and processing in Burkitt lymphoma. *Oncogene* 26: 3769-3776.
26. Krichevsky, A & Gabriely, G. (2009). miR-21: a small multi-faceted RNA. *Journal of Cellular and Molecular Medicine*, 13(1): 39-53.
27. Kumarswamy, R. Lyon, A. Volkmann, I. Mills, A. Bretthauer, J. Pahuja, A. Geers, C. Kraft, T. Hajjar, R. Macleod, K. Harding, S. Thum, T. (2012). SERCA2a gene therapy restores microRNA-1 expression in heart failure via an Akt/FoxO3A-dependent pathway. *Eur Heart Journal*, 33(9):1067-1075.



28. La Fuente, Z. (2006). Inmunología de la infección por T. Cruzi y de la enfermedad de Chagas. *Revista de Enfermedades Emergentes*, 8(1):17-19.
29. Latif, N. Khan, M. Birks, E. O'Farrell, A. Westbrook, J. Dunn, M. Yacoub, M. (2000). Upregulation of the Bcl-2 family of proteins in end stage heart failure. *Journal of the American College of Cardiology*, 35(7): 1769-1777.
30. Lee BY, Bacon KM, Bottazzi ME, Hotez PJ. (2013). Global economic burden of Chagas disease: a computational simulation model. *Lancet Infectious Diseases*, 13(4): 342-348.
31. Lee, Y. Andaloussi, S. Wood, M. (2012). Exosomes and microvesicles: extracellular vesicles for genetic information transfer and gene therapy. *Human Molecular Genetics*, 21(1): R125–R134
32. Leon, J. Wang, K. Engman, D. (2003). Myosin Autoimmunity Is Not Essential for Cardiac Inflammation in Acute Chagas' Disease. *The Journal of Immunology*, 171(8): 4271-4277.
33. Lim, D. Lutucuta, S. Bachireddy, P. Youker, K. Evans, A. Entman, M. Roberts, R. Marian, A. (2000). Angiotensin II Blockade Reverses Myocardial Fibrosis in a Transgenic Mouse Model of Human Hypertrophic Cardiomyopathy. *Journal of the American Heart Association*, 103(1): 789-791.
34. Linhares, L. Granato, A. Gomes, J. Conde, L. Freire, L. De Freitas, E. Freire, C. Coutinho, S. De Alcantara, J. Pedrosa, R. Savino, W. Morot, A. (2018). Circulating Plasma MicroRNA-208a as Potential Biomarker of Chronic Indeterminate Phase of Chagas Disease. *Frontiers in Microbiology*, 18(9): 269.1-269.9.
35. Madrid, A. Quera, R. Defilippi, C. Defilippi, C. Gil, L. Sapunar, J. Henríquez, A. (2004). Alteraciones motoras gastrointestinales en la enfermedad de Chagas. *Revista Médica de Chile*, 132(8): 939-946.
36. Manzano, R. Siles, M. (2012). MicroRNAs in parasitic diseases: Potential for diagnosis and targeting. *Molecular and Biochemical Parasitology*, 186(2): 81-86.
37. Marin, J. Cunha, E. Maciel, B. Simões, M. (2007). Pathogenesis of Chronic Chagas Heart Disease. *American Heart Association, Inc*, 115 (9): 1109-1123.
38. Molina, I. Salvador, F. Sánchez, A. (2015). Actualización en enfermedad de Chagas. *Revista de Enfermedades Infecciosas Microbiología Clínica*, 34(1): 132-8.
39. Montecinos, L. (2007). Identificación molecular de cepas de Trypanosoma cruzi y su análisis filogenético mediante secuenciación del gen para citocromo B. Tesis profesional de Médico veterinario. Chile. Universidad de Chile.
40. Nagajyothi, F. Machado, F. Burleigh, B. Jelicks, L. Scherer, P. Mukherjee, S. Lisanti, M. Weiss, L. Garg, N. Tanowitz, H. (2012). Mechanisms of Trypanosoma cruzi persistence in Chagas disease. *Cellular Microbiology*, 14(5): 634-643.
41. Navarro, I. Ferreira, F. Nakaya, H. IBaron, M. Vilar-Pereira, G., Pereira, I. Goncalves, A. Monte, J. Brito, T. Chevillard, C. Lannes, J. Kalil, J. Cunha, E. Rodriguez, L. (2015). MicroRNA Transcriptome Profiling in Heart of Trypanosoma



- cruzi-Infected Mice: Parasitological and Cardiological Outcomes. PLoS Neglected Tropical Diseases, 9(6): 1- 17.
42. Oliveira, V. Oliveira, Vitor C. Morita, S. Veiga, G. Alcides, E. (2012). MicroRNAs: ¿un nuevo paradigma en el tratamiento y diagnóstico de la insuficiencia cardíaca?. Arquivos Brasileiros de Cardiologia, 98(4): 362-370.
  43. OPS. (2016). Información general: Enfermedad de Chagas. 22 de Mayo de 2018, de OPS Sitio web: <https://goo.gl/nRZALJ>
  44. Palmer, P. (2003). The Imagining of tropical. 23 de Mayo de 2018, de ISR, Universidad de California Sitio web: <https://goo.gl/YHG9nA>
  45. Paz, M. Salazar, S. De Haro, I. Cabrera, B. (2005). Tres especies de triatomíneos y su importancia como vectores de Trypanosoma cruzi en México. Revista Médica de Buenos Aires, 65(1): 63-69.
  46. Pereira, M. Dones, W. Morillo, A. Encina, J. & Ribeiro, A. (2013). Chagas Disease: An overview of clinical and epidemiological aspects. Journal of the American College of Cardiology, 62 (9): 735-1097.
  47. Pettersen, N & Llorente, A. (2018). Current knowledge on exosome biogenesis and release. Cellular and Molecular Life Sciences, 75(2):193–208.
  48. QUIAGEN. (2015). exoRNeasy Serum/Plasma Handbook. 08 de Junio de 2018, de QUIAGEN. Sitio web: <https://goo.gl/qEqT9u>
  49. Ramsey, J. Ordoñez, R. Tello, A. Pohls. Sanchez, V. Peterson, A. (2003). Actualidades sobre la Epidemiología de la Enfermedad de Chagas en México: Iniciativa para la Vigilancia y el Control de la Enfermedad de Chagas en la República Mexicana. Cuernavaca: México. INSP. 85-103
  50. Raposo, G. & Stoorvogel, W. (2013). Extracellular vesicles: Exosomes, microvesicles, and friends. The journal of cell biology, 200(4): 373-383.
  51. Rassi, A. Rassi, A. Marín, J. (2009) Chagas heart disease: pathophysiologic mechanism, pronostic factor and risk stratificación. Mem Inst Oswaldo Cruz, 104 (1): 152-158.
  52. Rodrigues, L. Farage, A., Honorato, R. Camillo, P. Andrade, M. Cunha, I. Benvenuti, L. Inácio, A. Alcides, M. Stolf, N. Chevillard, C. Kalil, J. Cunha, E. (2014). MicroRNAs *miR-1*, *miR-133a*, *miR-133b*, *miR-208a* and *miR-208b* are dysregulated in Chronic Chagas disease Cardiomyopathy. International Journal of Cardiology, 175 (3): 409-417.
  53. Rooij, E & Olson, E. (2007). MicroRNAs: powerful new regulators of heart disease and provocative therapeutic targets. Journal of Clinical Investigation, 117(9): 2369-2376.
  54. Rooij, E. Quiat, D. Johnson, B. Sutherland, L. Qi, X. Richardson, J. Kelm, R. Olson, E. (2009). A family of microRNAs encoded by myosin genes governs myosin expression and muscle performance. *Developmental Cell*, 17(5): 662–673.
  55. Salomon, J. (2011). Determinación de la seroprevalencia a trypanosoma cruzi (kinetoplastida: trypanosomatidae) y su asociación con el vector (hemíptera:





- triatominae) en el estado de Quintana Roo. Tesis de doctorado en ciencias. México. Universidad Autónoma de Nuevo León.
56. Scharfstein, J. Montero, C. Schmitz. V. Svensjö, E. (2008). Angiotensin-converting enzyme limits inflammation elicited by *Trypanosoma cruzi* cysteine proteases: a peripheral mechanism regulating adaptive immunity via the innate kinin pathway. *Biological Chemistry*, 389(8):1015–1024.
  57. SINAVE (2015). Programa de Acción Específico. Prevención y control de la Enfermedad de Chagas 2013-2018. Programa Sectorial de Salud. México
  58. Sosa, S. Segura, E. (1999). Tratamiento de la infección por *T. cruzi* en fase indeterminada experiencia y normatización actual en la Argentina. *Centro Nacional de Diagnóstico e Investigación de Endemo-epidemias*. 59(2): 166-170.
  59. Souza, W. Barrias. E. (2017). Exosomes in the Pathogenic Protozoan *Trypanosoma Cruzii*. *International Journal of Pathology and Clinical Research*, 3(1): 1-9.
  60. Storino, R. Milei, J. (1994). Enfermedad de Chagas (Capítulo 1: Introducción). Buenos Aires, Argentina. Ed Mosby Doyma.
  61. Torreani, A. (2013). Cardiopatía Chagásica. *Memorias del Instituto de Investigaciones en Ciencias de la Salud*, 11(2): 65-77.
  62. Turchinovich, A. Samatov, T. Tonevitsky, A. Burwinkel, B. (2013). Circulating miRNAs: cell–cell communication function?. *Frontiers in Genetics*, 4(119): 1-10.
  63. Uribarren, T. (2018). Enfermedad de Chagas. 23 de Mayo de 2018, de UNAM, FacMed Sitio web: <https://goo.gl/bUC8Z7>
  64. Vázquez, G. Piña, P. Salcedo, M. (2006). Grandes alcances de los RNAs pequeños RNA interferencia y microRNA. *Revista de Investigación clínica*, 58(4): 335-349.
  65. Wang, B. Wu, G. Cheng, W, Shyu, K. (2013). Mechanical stretch via transforming growth factor- $\beta$ 1 activates microRNA-208a to regulate hypertrophy in cultured rat cardiac myocytes. *Journal of the Formosan Medical Association*, 112(10): 635-643.
  66. Wang, C. Zhang, C. Liu, L. A, X. Chen, B. Li, Y. Du, J. (2017). Macrophage-Derived mir-155-Containing Exosomes Suppress Fibroblast Proliferation and Promote Fibroblast Inflammation during Cardiac Injury, *Molecular Therapy*, 25(1): 192–204.
  67. World Health Organization. (2010). First WHO Report on Neglected Tropical Diseases: Working to Overcome the Global Impact of Neglected Tropical Diseases. Geneva: World Health Organization. 1–172.
  68. World Health Organization. (2018). Chagas disease (American trypanosomiasis). 22 de Mayo de 2018, de WHO Sitio web: <https://goo.gl/UTyeXs>
  69. Zhang, J. Li, S. Li, L. Li, M. Guo, C. Yao, J. Mi, S. (2015). Exosome and Exosomal MicroRNA: Trafficking, Sorting, and Function. *Genomics, Proteomics & Bioinformatics*, 13(1). 17-24.