

Análisis proteómico y metabolómico en el miocardio de pacientes con cardiopatía chagásica
crónica y cardiomiopatía no chagásica

Martha Lucía Díaz Galvis

Memoria para optar al grado de Doctor en Ciencias Básicas

Directora:

Clara Isabel González Rugeles

PhD en Ciencias Biológicas

Universidad Industrial de Santander

Facultad de Salud

Departamento de Ciencias Básicas

Doctorado en Ciencias Básicas Biomédicas

Bucaramanga

2023

Agradecimientos

Haber llegado hasta este momento no ha sido fruto de la casualidad ni únicamente del esfuerzo que haya podido destinar por mí misma, ha sido en gran parte por la confianza que muchas personas han volcado en mí y en todo el conocimiento que me han permitido adquirir, no únicamente científico-técnico sino también este recorrido ha sido un aprendizaje personal y emocional.

En primer lugar, quiero agradecer a la Dra Clara Isabel González, mi mentora y directora de este gran proyecto, agradecerle la confianza que ha depositado en mí, la oportunidad de trabajar en su grupo de investigación y mostrarme el camino de la investigación científica. También agradezco al Dr Arteaga, por su apoyo y enseñanzas del quehacer científico, a la Dra María Adelaida en CIDEIM y al Dr Richard Burchmore por abrirme el camino en el apasionante mundo “untargeted metabolomics workflow” fue todo un honor conocerlos y la mejor de mis experiencias trabajar en el laboratorio de proteómica y metabolómica del Instituto Glasgow Polyomics en Glasgow, Escocia. Agradezco también el apoyo del Dr Ignacio Casal, en el Centro de Investigaciones Biológicas de Madrid, España, por recibirme en su laboratorio así como también especial agradecimiento a la Dra Viviana de los Rios por toda su ayuda, paciencia y tiempo con los análisis de integración, quien además me hizo sentir como en casa. Al Doctor Julio Cesar Mantilla gracias por sus enseñanzas y al Dr Luis Eduardo Echeverría por su apoyo constante.

A todos mis compañeros de Laboratorio Central de Investigaciones, y en especial a los del grupo de Investigación, Mayra Alejandra M, Erika, Mayra Alejandra J y Elkin Fabian, con quienes

no solo compartí un espacio en el laboratorio, sino también conversaciones, algún café y siempre la buena energía, positivismo y mucha alegría, gracias.

Finalmente, agradecer a los que siempre han estado y estarán, mi padre Alfonso y mi madre María Omaira, a quienes debe todo lo que soy, a mis hijos, Juan Sebastián y Daniel Eduardo, que son lo mejor de mi vida y a ellos les dedico este logro.

Contenido

	Pág.
Introducción	20
1. Marco Teórico.....	24
1.1 Enfermedad de Chagas (EC).....	24
1.1.1 Generalidades.....	24
1.1.2 Epidemiología de la EC	26
1.1.3 Agente etiológico (<i>Trypanosoma cruzi</i>)	28
1.1.3.1 Morfología y ciclo de vida del <i>Trypanosoma cruzi</i>	28
1.1.3.2 Genética del <i>Trypanosoma cruzi</i>	30
1.1.4 Formas de transmisión de la EC	31
1.1.4.1 Transmisión vectorial.....	31
1.1.4.2 Transmisión por transfusión sanguínea.	32
1.1.4.3 Transmisión oral.	32
1.1.4.4 Transmisión congénita.	33
1.1.4.5 Transmisión a través de órganos.....	33
1.1.5 Historia natural de la Enfermedad de Chagas	34
1.2 Cardiomiopatía Chagásica Crónica (CCC).....	36
1.2.1 Generalidades de la CCC.....	36
1.2.2 Manifestaciones Clínicas de la CCC.....	37
1.2.3 Patología de la CCC.....	41
1.2.3.1 Aspectos macroscópicos de la CCC.	41

1.2.3.2 Alteraciones microscópicas en el compartimento no miocítico.	44
1.2.4 Aspectos clínico-patológicos de la CCC.....	45
1.2.5 Mecanismos de la patogénesis de la CCC	46
1.2.5.1 Persistencia del parásito en el tejido.	47
1.2.5.2 Autoinmunidad.	48
1.2.5.3 Disautonomía cardíaca.....	50
1.2.5.4 Alteraciones microvasculatura.....	50
1.2.5.5 Estructura y organización de la fibra miocárdica.	51
1.2.6 Respuesta Inmune durante la CCC	53
1.2.6.1 Respuesta inmune durante la fase aguda de la EC.....	53
1.2.6.2 Respuesta inmune durante la fase crónica de la EC	56
1.2.6.2.1 Fase indeterminada (IND).....	56
1.2.6.2.2 Respuesta inmune Innata en la fase crónica.	56
1.2.6.2.3 Respuesta inmune adaptativa en la fase crónica.	57
1.2.7 Alteración de la matriz extracelular y remodelamiento.....	63
1.2.7.1 Interacción matriz extracelular – cardiomiocitos.....	66
1.2.8 Desregulación del metabolismo de la quinurenina	67
1.3 Cardiomiopatía no chagásica	68
1.3.1 Cardiomiopatía dilatada idiopática (CMD)	68
1.4 Herramientas ómicas.....	69
1.4.1 Proteómica	69
1.4.1.1 Proteómica basada en Espectrometría de masas	70
1.4.1.1.1 Cromatografía líquida (LC).	70

1.4.1.1.2. Espectrometría de masas (MS).	71
1.4.1.2 Proteómica Cuantitativa (PC).	73
1.4.1.3 Métodos de cuantificación relativa con marcaje.....	74
1.4.1.3.1 Marcaje metabólico mediante isótopos estables (SILAC).....	75
1.4.1.3.2 Marcaje químico isobárico con etiquetas de masa en tándem (TMT).	76
1.4.2 Metabolómica	78
1.4.2.1 Metabolómica basada en espectrometría de masas.....	79
1.4.2.1.1. Cromatografía de Interacción Hidrofílica (HILIC).....	80
1.5 Estudios proteómicos y metabolómicos que se han adelantado en Cardiomiopatía Chagasica Crónica.....	81
1.6 Integración de datos ómicos.....	83
1.6.1 Integración basada en ontología bioquímica.....	85
1.6.2 Modelamiento de los datos ómicos en redes biológicas	86
1.6.3 Análisis de correlación empírico	87
2. Objetivos.....	89
2.1 Objetivo General.....	89
2.2 Objetivos Específicos.....	89
3. Materiales y Métodos.....	90
3.1 Aspectos éticos.....	90
3.2 Recolección de las muestras	90
3.3 Análisis histopatológico.....	91
3.4 Análisis proteómico	92
3.4.1 Homogenización del tejido, extracción y lisis de proteínas.....	92

3.4.2 Cuantificación de péptidos usando “Tándem Mass Tags” (TMT)	92
3.4.3 LC-MS/MS	94
3.4.4 Análisis de datos de espectrometría de masas	95
3.4.5 Análisis y normalización de los datos proteómicos.....	96
3.4.6 Herramientas bioinformáticas utilizadas para el análisis proteómico.....	98
3.4.7 Inmunodetección de Proteínas	99
3.4.7.1 Anticuerpos primarios.....	99
3.4.7.2 Anticuerpos secundarios.	99
3.4.7.3 Western Blot.	100
3.5 Análisis metabolómico.....	101
3.5.1 Extracción de los metabolitos a partir del tejido cardíaco	101
3.5.2 Cromatografía líquida (pHILIC) /Espectrometría de masas (LC-MS).....	102
3.5.3 Control de calidad para la monitorización de experimentos metabólicos	104
3.5.4 Análisis de Datos	104
3.5.4.1 Procesamiento de datos.....	105
3.5.4.2 Tratamiento de los datos.	105
3.5.4.3 Análisis estadísticos de datos metabolómicos.	106
3.5.4.3.1 Análisis de componentes principales (PCA).....	106
3.5.5 Identificación de los metabolitos y análisis de vías.....	106
3.5.5.1 Niveles de identificación.....	107
3.6 Análisis integrado de resultados proteómicos y metabolómicos	108
3.7 Análisis estadístico.....	108
4. Resultados.....	109

4.1 Características epidemiológicas de los grupos CCC, CNC y grupo control sano en el análisis proteómico	109
4.2 Análisis histopatológico del tejido cardiaco	111
4.3 Análisis proteómico mediante espectrometría de masas	113
4.3.1 Análisis de expresión diferencial del proteoma de tejido cardiaco humano en la comparación CCC vs sano	118
4.3.2 Análisis de expresión diferencial del proteoma de tejido cardiaco humano en la comparación CCC vs CNC	130
4.3.3 Análisis de expresión diferencial del proteoma de tejido cardiaco humano en la comparación CNC vs sano.....	138
4.4 Resultados del análisis metabólico	144
4.4.1 Análisis comparativo del perfil metabólico en la comparación CCC vs sano.....	145
4.4.1.1 Análisis de vías funcional y metabólico.	150
4.4.2 Análisis comparativo del perfil metabólico en la comparación CCC vs CNC.....	153
4.5 Resultados del análisis de integración	157
4.6 Integración de los datos en la comparación CCC vs CNC	158
4.6.1 Análisis integrado para la identificación de vías canónicas.....	158
4.6.2 Análisis integrado para la identificación de las funciones biológicas y enfermedades “Biofunciones”	163
4.6.2.1 Identificación de las funciones moleculares y celulares en el set de datos proteómicos y metabólicos diferenciales.....	164
4.6.2.2 Identificación de funciones y desarrollo del sistema fisiológico en el conjunto de datos proteómicos y metabólicos diferenciales.....	165

4.6.2.3 Identificación de enfermedades y desórdenes en el set de datos proteómico y metabolómico diferencial.	166
4.6.3 Análisis integrado para la identificación de redes moleculares afectadas en la comparación CCC vs CNC.....	166
4.6.4 Análisis integrado para identificar las funciones asociadas a toxicidad (funciones Tox) .	169
4.6.5 Análisis integrado para la identificación de reguladores efectores.....	170
5. Discusión.....	172
5.1 Análisis proteómico	173
5.1.1 Análisis proteómico diferencial del miocardio entre CCC vs Controles sanos.....	174
5.1.2 Análisis proteómico en la comparación CCC vs CNC	179
5.2. Análisis metabolómico.....	182
5.2.1 Análisis metabolómico diferencial en la comparación CCC vs Sano.....	183
5.2.2 Análisis metabólico CCC vs CNC.....	192
5.3 Análisis integrado de proteínas y metabolitos diferenciales.....	197
5.3.1 Análisis integrado de proteínas y metabolitos diferenciales en la comparación CCC vs CNC	197
5.3.1.1 Análisis de vías canónicas.	197
5.3.1.2 Análisis de las principales funciones biológicas.....	200
5.3.1.3 Análisis de las principales redes de interacción molecular.....	201
6. Conclusiones	211
Referencias Bibliográficas	214
Apéndices.....	254

Lista de Figuras

	Pág.
Figura 1. Distribución mundial de la EC.	28
Figura 2. Ciclo de vida del Trypanosoma cruzi.	30
Figura 3. Características macroscópicas de la CCC.	41
Figura 4. Patología macroscópica de la cardiomiopatía chagásica crónica	43
Figura 5. Mecanismos de la persistencia de T. cruzi en el hospedero mamífero.	48
Figura 6. Papel de los neutrófilos en la infección por Trypanosoma cruzi.	57
Figura 7. Esquema de la estructura del espectrómetro de masas y analizador tipo Orbitrap.	73
Figura 8. Métodos para la cuantificación relativa de proteínas.	75
Figura 9. Estructura molecular de las etiquetas de masas para marcaje isobárico (TMT).	76
Figura 10. Esquema de marcaje químico mediante TMT-6plex.	78
Figura 11. Representación esquemática del diseño experimental empleado en el análisis proteómico cuantitativo.	93
Figura 12. Flujograma del procedimiento para la extracción de metabolitos a partir de tejido cardíaco.	101
Figura 13. Imágenes representativas de secciones de tejido miocárdico.	112
Figura 14. Histopatología de secciones de tejido miocardio (Ventrículo izquierdo) teñido con hematoxilina & eosina.	112
Figura 15. Gráfico de cajas con datos de expresión posterior a la normalización.	114
Figura 16. Análisis de componente principal.	115

Figura 17. Mapa de calor y análisis de agrupamiento jerárquico de las proteínas expresadas diferencialmente cuando se comparó el grupo de pacientes con CCC, CNC y control sano.	117
Figura 18. Gráfico Volcano en la comparación CCC/sano.....	119
Figura 19. Análisis funcional de las proteínas expresadas diferencialmente en la comparación CCC vs sano.....	127
Figura 20. Análisis mediante STRING, de la conexión funcional entre las proteínas desreguladas al en el grupo CCC con respecto al control sano, identificadas por espectrometría de masas. ..	129
Figura 21. Gráfico Volcano de proteínas expresadas diferencialmente en la comparación CCC vs CNC.	131
Figura 22. Análisis funcional de las proteínas diferenciales en la comparación CCC vs CNC .	135
Figura 23. Reactoma de las proteínas expresadas diferencialmente en la comparación CCC vs CNC.	136
Figura 24. Red de interacción proteína- proteína usando STRING en la comparación CCC vs CNC.	137
Figura 25. Gráfico Volcano entre la comparación CNC vs sano.....	138
Figura 26. Análisis de enriquecimiento funcional GO de las proteínas diferenciales en la comparación CNC vs sano.....	141
Figura 27. Red de interacción proteína-proteína en la comparación CNC vs sano	142
Figura 28. Validación por western blot de los niveles de expresión de las proteínas estadísticamente significativas.....	143
Figura 29. Gráfico del análisis de componente principal que presenta los puntajes del primer y segundo componente.....	145
Figura 30. Gráfico de análisis de componentes principales (PCA).	146

Figura 31. Mapa de calor y análisis de agrupamiento jerárquico de metabolitos diferenciales entre CCC vs Control sano.	148
Figura 32. Gráfico volcano de los metabolitos en la comparación CCC vs control sano.....	149
Figura 33. Descripción general del enriquecimiento de vías en Metaboanalyst.....	151
Figura 34. Gráfico correspondiente al análisis de componentes principales (PCA) de los datos del metaboloma del tejido cardiaco en la comparación CCC vs CNC.	154
Figura 35. Volcano plot en la comparación CCC vs CNC.	155
Figura 36. Análisis enriquecimiento de vías de los metabolitos diferenciales en la comparación CCC vs CNC.....	157
Figura 37. Histograma de vías canónicas afectadas en la comparación CCC vs CNC.	159
Figura 38. Estado de activación de las vías canónicas significativas con puntaje Z.	160
Figura 39. Representación de la superposición de las vías canónicas.	162
Figura 40. Clasificación en funciones biológicas y enfermedades.	164
Figura 41. Análisis de redes funcionales de proteínas y metabolitos expresados diferencialmente en la comparación CCC vs CNC. (A-C).....	168
Figura 42. Clasificación de las funciones tóxicas asociadas al conjunto de datos diferencial en la comparación CCC vs CNC	170
Figura 43. Reguladores corrientes arriba IL-5 y CCR2.....	171
Figura 44. Red mecanística identificada usando IPA donde IL-1 β es un regulador maestro (p=0.00213).....	172
Figura 45. Integración de diferentes vías metabólicas involucradas en la comparación CCC vs sano.	192
Figura 46. Modelo esquemático de las vías de degradación del triptófano.	196

Figura 47. Modelo integrador de los mecanismos moleculares subyacentes al desarrollo de la

CCC..... 210

Lista de Tablas

	Pág.
Tabla 1. Fases y etapas clínicas de la progresión de la enfermedad de Chagas de acuerdo con las guías de práctica clínica del Colegio Americano de Cardiología y la Asociación Americana del Corazón.....	36
Tabla 2. Principales factores etiológicos en la falla cardiaca.	39
Tabla 3. Asignación de los diferentes reactivos de marcaje (tags) a los grupos de estudio.	94
Tabla 4. Anticuerpos primarios utilizados en el Western Blot.	99
Tabla 5. Anticuerpos secundarios utilizados en Western Blot.	99
Tabla 6. Protocolo de gradiente empleado en la separación cromatográfica.....	103
Tabla 7. Características clínicas de los participantes del estudio.	110
Tabla 8. Proteínas sobreexpresadas significativamente en la comparación CCC vs sano.	120
Tabla 9. Proteínas reguladas a la baja significativamente en la comparación CCC vs sano.	124
Tabla 10. Proteínas sobreexpresadas significativamente en la comparación CCC vs CNC.	132
Tabla 11. Proteínas disminuidas significativamente en la comparación CCC vs CNC.....	134
Tabla 12. Proteínas sobreexpresadas en la comparación CNC vs sano.....	139
Tabla 13. Proteínas disminuidas en la comparación CNC vs sano.....	140
Tabla 14. Metabolitos detectados significativamente entre los grupos CCC vs sano.	152
Tabla 15. Lista de los metabolitos expresados diferencialmente entre CCC vs CNC.....	156
Tabla 16. Vías moleculares y número total de genes compartidos en cada vía.....	161
Tabla 17. Funciones celulares y moleculares detectadas en la comparación CCC vs CNC.....	165

Tabla 18. Funciones asociadas al desarrollo del sistema fisiológico detectadas en la comparación CCC vs CNC.....	165
Tabla 19. Primeras cinco enfermedades asociadas al set de datos diferenciales de la comparación CCC vs CNC.....	166

Lista de Apéndices

	Pág.
Apéndice A. Listado de estándares para metabolómica	254
Apéndice B. Análisis histopatológico de los tejidos de miocardio.....	261
Apéndice C. Tabla con el análisis Gene Ontology en la comparación CCC vs sano.	264
Apéndice D. Tabla con las vías canónicas obtenidas a partir del análisis integrado de las proteínas y metabolitos en la comparación CCC vs CNC	265
Apéndice E. Lista de funciones biológicas generado por la integración de los datos proteómicos y metabolómicos.	268
Apéndice F. Tabla con los datos generales del análisis metabolómico.	272

Abreviaturas

AHA	Asociación Americana del Corazón (del inglés, <i>American Heart Association</i>)
AVAD	Años de vida ajustados por discapacidad
EC	Enfermedad de Chagas
ESI	Ionización por electrospray (del inglés, <i>Electrospray Ionization</i>)
CCC	Cardiomiopatía Chagásica Crónica
HMDB	Base de datos del metaboloma humano (del inglés, <i>Human Metabolome Database</i>)
IC	Intervalo de confianza
LC- MS/MS	Cromatografía líquida acoplada a espectrometría de masas tándem (del inglés, <i>Liquid-Chromatography coupled to Mass Spectrometry</i>)
OMS	Organización Mundial de la Salud
PCA	Análisis de componentes principales (del inglés, <i>Principal Component Analysis</i>)
QC	Control de calidad (del inglés, <i>quality Control</i>)
rpm	Revoluciones por minuto
RT	Tiempo de retención (del inglés, <i>Retention Time</i>)
TMT	Etiqueta de masa (del inglés, <i>Tándem mass Tag</i>)
WB	Western Blot

Resumen

Título: Análisis proteómico y metabolómico en el miocardio de pacientes con cardiopatía chagásica crónica y cardiomiopatía no chagásica*

Autora: Martha Lucía Díaz Galvis**

Palabras Claves: *Cardiomiopatía Chagásica, proteómica, metabolómica, enfermedad de Chagas.*

Descripción:

La Cardiomiopatía Chagásica Crónica (CCC) es una enfermedad endémica en Latinoamérica y presenta un nivel inaceptablemente alto de morbilidad y mortalidad. El proceso y los mecanismos patofisiológicos son complejos y aunque se sabe que la disfunción microvascular, la inflamación y la fibrosis cardíaca están involucrados en la patología el mecanismo completo detrás del desarrollo de la insuficiencia cardíaca sigue siendo poco claro. Por tanto, en este estudio se planteó realizar un análisis integrado del perfil proteómico y metabolómico del miocardio de pacientes con CCC, cardiomiopatía no chagásica (CNC).

El perfil proteómico diferencial entre los grupos detectó 160 proteínas. Entre ellas, 45 se expresaron de forma diferencial entre CCC y CNC. Estas proteínas estuvieron implicadas en la remodelación del citoesqueleto, organización de la matriz extracelular y respuesta inmunitaria. Entre los metabolitos, triptofanoamida y triptófano fueron regulados a la baja en el grupo CCC, mientras que el ácido 9,10,13-trihidroxi-(E)-11-octadecenoico, y la quinurenina se encontraron aumentados. El análisis integrado encontró 30 vías canónicas enriquecidas. Entre ellas, la activación de la señalización de RhoA, del citoesqueleto de actina, la biosíntesis de L-carnitina, la respuesta al estrés oxidativo mediada por Nrf2 y la degradación del triptófano. Asimismo, el análisis de interacción reveló 5 potenciales reguladores transcripcionales (AKT, NFkB, VEGF, ERK y P38) asociados a la patología e identificó 3 reguladores anteriores (IL-5, CCR2 e IL-1β).

En general, nuestros resultados muestran profundas alteraciones en el metabolismo energético del tejido cardíaco con CCC que ponen de manifiesto un gran déficit energético en el miocardio durante la fase final de la insuficiencia cardíaca secundaria a CCC. Además, la inflamación, la modulación de la respuesta inmunitaria, el estrés oxidativo y la remodelación tisular constituyen los principales mecanismos fisiopatológicos subyacentes a la insuficiencia cardíaca chagásica. Finalmente, se proponen nuevos biomarcadores y mecanismos como blancos potenciales para el desarrollo de fármacos.

* Proyecto de Grado

** Facultad de Salud Departamento de Ciencias Básicas Doctorado en Ciencias Básicas Directora: Clara Isabel González Rugeles

Abstract

Title: Proteomic and metabolomic analysis in the myocardium of patients with chronic chagasic cardiomyopathy and non-chagasic cardiomyopathy*.

Author: Martha Lucía Díaz Galvis**

Key words: Chronic Chagasic Cardiomyopathy, Proteomics, Metabolomics and Chagas disease.

Description:

Chronic Chagasic Cardiomyopathy (CCC) is an endemic disease in Latin America and presents an unacceptably high level of morbidity and mortality. The pathophysiological process and mechanisms are complex and although microvascular dysfunction, inflammation, and cardiac fibrosis are known to be involved in the pathology the complete mechanism behind the development of heart failure remains unclear. Therefore, in this study, we set out to perform an integrated analysis of the proteomic and metabolomic profiling of the myocardium of patients with CCC, non-chagasic cardiomyopathy (NCC).

Differential proteomic profiling between the groups detected 160 proteins. Among them, 45 were differentially expressed between CCC and NCC. These proteins were involved in cytoskeleton remodeling, extracellular matrix organization, and immune response. Among metabolites, tryptophanamide and tryptophan were downregulated in CCC, while 9, 10, 13, Trihydroxy-11-octadecenoic acid, and kynurenine were increased. The integrated analysis found 30 enriched canonical pathways. These included activation of RhoA signaling, actin cytoskeleton, L carnitine biosynthesis, Nrf2-mediated oxidative stress response, and tryptophan degradation. Likewise, interaction analysis revealed 5 potential transcriptional regulators (AKT, NFkB, VEGF, ERK, and P38) associated with the pathology and identified 3 upstream regulators (IL-5, CCR2, and IL-1 β).

Overall, our results show profound alterations in the energy metabolism of cardiac tissue with CCC which highlights a large energy deficit in the myocardium during the late phase of heart failure secondary to CCC. In addition, inflammation, modulation of the immune response, oxidative stress, and tissue remodeling constitute the main pathophysiological mechanisms underlying Chagasic heart failure. Finally, our study provides novel insights into the underlying mechanisms of the disease and contributes identify potential targets for novel drugs.

* Project of grade

** Facultad de Salud Departamento de Ciencias Básicas Doctorado en Ciencias Básicas Directora: Clara Isabel González Rugeles

Introducción

La **enfermedad de Chagas (EC)** es una enfermedad parasitaria causada por el protozoario *Trypanosoma cruzi*, es transmitida por insectos vectores hemípteros de la subfamilia Triatominae, (En Colombia, estos insectos son conocidos como “pitos”), afecta principalmente a personas que habitan en regiones pobres u olvidadas de Centro y Suramérica, y a pesar de los esfuerzos implementados para el control de la transmisión, esta continúa siendo un problema de salud pública en la región. Según la Organización Mundial de la Salud (OMS) hay aproximadamente 6 millones de personas infectadas en el mundo (WHO, 2022). En Colombia, se estima que existen entre 700.000 a 1.200.000 personas infectadas y cerca de 8 millones estarían en riesgo de adquirir la infección (Guhl, 2005). En Santander, uno de los departamentos con mayor endemia, se han presentado, además, casos y brotes de Chagas agudo con alta morbilidad y mortalidad (Díaz y González, 2014) (Díaz et al., 2015).

La EC presenta dos etapas o fases clínicas: una fase aguda y una crónica. La fase aguda se presenta una o dos semanas después de la infección, generalmente cursa con síntomas inespecíficos y se caracteriza por su alta parasitemia. La mayoría de los infectados permanecen asintomáticos toda su vida, este periodo de la enfermedad es también conocido como fase indeterminada (FI), sin embargo, años a décadas después, 20 al 30% de los infectados y en FI desarrollan un cuadro crónico con síntomas asociados a daño en órganos como: cerebro, esófago, colon y corazón.

La **Cardiomiopatía Chagásica Crónica (CCC)** es la presentación clínica más importante de la EC, se caracteriza por diversas alteraciones cardiovasculares de carácter estructural y

funcional, las cuales se producen como consecuencia de la inflamación. Las células miocárdicas se observan rodeadas de infiltrado inflamatorio y durante este proceso experimentan miocitólisis y necrosis, esta pérdida de tejido posteriormente es sustituida por tejido fibroso. El infiltrado inflamatorio consiste predominantemente en linfocitos CD8⁺ y, con menor frecuencia linfocitos T CD4⁺. Estas células participan en la generación de lesiones en el tejido como consecuencia de la producción local de citocinas proinflamatorias y de los mecanismos citotóxicos en los que intervienen los linfocitos T CD8⁺. Adicionalmente, el sistema de conducción, las fibras y neuronas cardíacas también son afectadas. Las áreas de hipertrofia, focales o difusas, suelen coexistir con una intensa fibrosis de tipo reparativo, al tiempo se produce sustitución y depósito intersticial de fibras de colágeno. Todos estos eventos conducen a miocarditis y alteraciones en el sistema de conducción cardíaco causando arritmias ventriculares, tromboembolismo, falla cardíaca (FC), alteraciones microvasculares y muerte súbita (Marín-Neto, 2009; Ribeiro et al., 2012).

La CCC presenta un peor pronóstico frente a otras cardiomiopatías dilatadas no chagasicas (CNC) es decir, de diferente etiología (isquémica, hipertensiva e idiopáticas), lo cual se refleja en la alta morbilidad y mortalidad observada en los pacientes con CCC (Nunes, 2010). De hecho, altos niveles de INF γ , FNT α , CCL2, CCR1 y CCR2 han sido asociados con mayor severidad en pacientes con CCC en comparación a individuos infectados con *T. cruzi* pero asintomáticos (Batista et al., 2018). Otros estudios han propuesto diversos factores como la autoinmunidad (Engmann et al., 2002), la persistencia del parásito (Tarleton y Zhang, 1999) o alteraciones vasculares (Tanowitz et al., 1996) como causantes de la progresión. Adicionalmente, evidencia reciente indica que podría haber asociación entre el grado de inflamación crónica en el tejido cardíaco y procesos de desregulación metabólica (Palomer et al., 2016); sin embargo, a pesar de estos avances, aún no se conocen las causas subyacentes de la progresión hacia FC.

Es probable que múltiples procesos fisiológicos, bioquímicos y moleculares que incluyen inflamación, stress oxidativo, activación neurohormonal, remodelamiento del ventrículo izquierdo entre otros; podrían estar actuando de manera conjunta en el desarrollo de la cardiomiopatía. Por lo tanto, conocer estas alteraciones permitirá dilucidar los procesos adaptativos intra y extracelulares involucrados en la homeostasis metabólica durante la CCC. A la fecha, no hay vacunas disponibles y el manejo terapéutico de la FC no difiere significativamente de los tratamientos comunes establecidos para la cardiomiopatía dilatada (Viotti, 2006), y en los casos más graves, las únicas opciones terapéuticas disponibles son: el implante de dispositivos de asistencia ventricular izquierda (DAVI) y el trasplante de corazón. Lo anterior, pone en evidencia la necesidad de estudiar la fisiopatología de la EC, en particular los mecanismos celulares y moleculares subyacentes al desarrollo de la FC y los factores que determinan por qué algunos individuos permanecen asintomáticos mientras otros desarrollan diferentes grados de daño cardíaco.

Dada la complejidad y heterogeneidad de la etiología de FC, numerosas aproximaciones experimentales han sido implementadas, las cuales han establecido que las cardiomiopatías en general están asociadas con alteraciones en el metabolismo energético (Abel et al., 2011). En cuanto a la CCC, un estudio previo realizado por nuestro grupo de investigación (GIEM), en el cual se compararon los perfiles proteicos del miocardio de pacientes con CCC y CNC, se detectaron cambios en la expresión de proteínas relacionadas con el metabolismo energético y citoesqueleto. Por otra parte, un análisis metabolómico en miocardio a partir de modelo murino con cardiomiopatía Chagásica aguda evidenció alteraciones en los niveles de acilcarnitinas, fosfocolina y otros metabolitos, los cuales se correlacionaron con inflamación (Hoffman et al.,

2020). Cabe señalar, que a la fecha no hay reportes relacionados con el análisis global proteómico y metabolómico en el miocardio de pacientes con CCC.

Actualmente, las tecnologías ómicas son empleadas como herramientas de alto rendimiento en la investigación de las enfermedades cardiovasculares ya que permiten la caracterización global y la cuantificación precisa de las proteínas y metabolitos en sistemas biológicos complejos, suministrando información relevante cuando se compara bajo condiciones patológicas distintas (Shen, 2015). Los diversos componentes de un sistema biológico no actúan individualmente, al contrario, se suceden interacciones no lineares, dinámicas y coordinadas entre **el proteoma y metaboloma**, de esta manera los niveles de proteínas obviamente afectaran el perfil metabólico, por ejemplo, a través de las reacciones enzimáticas o mediante las concentraciones de metabolitos ya que estos, podrían afectar la expresión de proteínas. Por su parte, la metabolómica involucra la medición de la actividad bioquímica directamente mediante el monitoreo de substratos y productos durante el metabolismo celular y dado que los metabolitos son el producto final de todos los procesos que ocurren en la célula, estos reflejan la adaptación de los sistemas biológicos a las condiciones patológicas. En este sentido, la combinación de estas dos aproximaciones ofrecerá nuevas perspectivas y podría conducir a un mejor entendimiento de los procesos responsables para la manifestación y progresión de la CCC. Con estos antecedentes, en este estudio se planteó realizar un análisis integrado del perfil proteómico y metabolómico del miocardio de pacientes con CCC y CNC, utilizando cromatografía líquida acoplada a espectrometría de masas (LC-MS/MS). La integración de la información obtenida nos permitió identificar vías metabólicas y proteínas asociadas con daño cardíaco. Adicionalmente, esta información facilitará la identificación de nuevos biomarcadores para el diagnóstico y detección

temprana de la enfermedad y blancos terapéuticos potenciales para el desarrollo de nuevos fármacos.

1. Marco Teórico

1.1 Enfermedad de Chagas (EC)

1.1.1 Generalidades

La EC también conocida como Tripanosomiasis americana (TA), es una enfermedad potencialmente mortal y es causada por el parásito protozoario *Trypanosoma cruzi* (*T. cruzi*). *Trypanosoma* se considera un género dixénico que infectan a los vertebrados, incluidos los humanos, y son transmitidos por invertebrados hematófagos (Kaufer et al., 2017). *T. cruzi* infecta más de 140 especies de insectos vectores hematófagos responsables de su transmisión (Hemíptera, Reduviidae, Triatominae) y hasta nueve ordenes de mamíferos: Didelphimorphia (marsupiales), Cingulata (armadillos), Rodentia (roedores), Carnívora (carnívoros), Artiodáctilo (cerdos, pecaríes), Chiroptera (murciélagos), Pilosa (perezosos, osos hormigueros), Lagomorpha (liebres y conejos) y Primate (primates) (Dias, 2000).

Desde un punto de vista eco epidemiológico la EC se considera inicialmente como una enzootia salvaje, la cual se mantiene entre los mamíferos selváticos y se transmite por especies de triatominos hematófagos, luego, se convirtió en una antropozoonosis con la entrada del hombre en

el entorno natural en el que circulaba *T. cruzi*. La ocupación de estos espacios por el hombre hizo que algunas especies de triatominos se introdujeran, por activa y por pasiva, en las viviendas humanas y se establecieran nuevos ciclos de transmisión. Así, el hombre y los animales domésticos pasaron a formar parte de la cadena epidemiológica de la EC, con la posibilidad de intercambiar *T. cruzi* entre los ciclos selvático y doméstico (Zingales y Bartholomeu, 2022).

La EC es endémica en 21 países de Centro y Suramérica donde a pesar de las intensas campañas implementadas para el control de la infección, aún la enfermedad representa un problema importante de salud pública en la región (WHO, 2021). En los últimos años la enfermedad ha cobrado importancia epidemiológica no sólo porque se ha incrementado la prevalencia, sino porque se ha informado sobre nuevos casos de la enfermedad en áreas no endémicas como Norteamérica, Europa y Japón; tal es el caso, de los Estados Unidos donde se reportó que aproximadamente 300.000 inmigrantes latinos se encuentran infectados (Bern y Montgomery, 2009). Así mismo, en España se encontró una prevalencia de 2.87% en los inmigrantes Latinoamericanos (Roca, 2011).

La EC es una enfermedad parasitaria desatendida y asociada a una importante mortalidad y morbilidad que incluye discapacidades a largo plazo, estigmatización social y una carga para la salud mental (Suárez et al., 2022). Actualmente, esta condición es clasificada por la OMS como una enfermedad tropical “desatendida” dado que las poblaciones más pobres suelen ser las más afectadas, además porque esta enfermedad recibe poca atención y es postergada dentro de las prioridades de la salud pública (Dias et al., 2015). El último informe de la organización panamericana de la salud (PAHO) resalta que menos del 10% de los infectados por la enfermedad de Chagas reciben un diagnóstico y un tratamiento a tiempo (PAHO, 2022).

1.1.2 Epidemiología de la EC

La EC causa una gran carga de morbilidad y mortalidad. En las Américas, se estima que la EC es responsable de 7.5 veces más años de vida ajustado por discapacidad (AVAD) que la malaria (PAHO, 2019). La EC se extiende en 21 países de Centro y Suramérica y pese a los esfuerzos implementados para el control de la transmisión y del vector, ésta aún continúa siendo un grave problema de salud pública para la región (Figura 1). En Latinoamérica, Bolivia, es el país que presenta la tasa de infección más alta (6.7%), seguido por Argentina (4.1%), Salvador (3.3%), Honduras (3.05%), Paraguay (2.54%). Este mismo informe reportó una tasa de prevalencia de 0.96% para Colombia, ubicando a Colombia en el doceavo lugar de prevalencia en Latinoamérica (Amieva, 2014). En Colombia, un metaanálisis reveló que el departamento del Casanare presenta la prevalencia más alta (7.0%, 95% IC: 2.2–12.6), siendo la población adulta (3.0%, 95% IC: 1.0–4.0) y las mujeres embarazadas (3.0%, 95% IC: 3.0–4.0) los grupos más afectados (Olivera et al., 2019).

A pesar de los esfuerzos realizados por los gobiernos de los países latinoamericanos para el control de la EC bajo la coordinación de la OMS/OPS, aún existen amplias áreas donde la transmisión de vectores está presente por diferentes causas: frentes de colonización, cambio de uso del suelo, migración humana, deforestación, cultivos industriales y minería entre otros. De la misma manera, el aumento de la temperatura ambiental y los efectos del cambio climático afectan la velocidad de transmisión vectorial (Guhl y Ramírez, 2021)

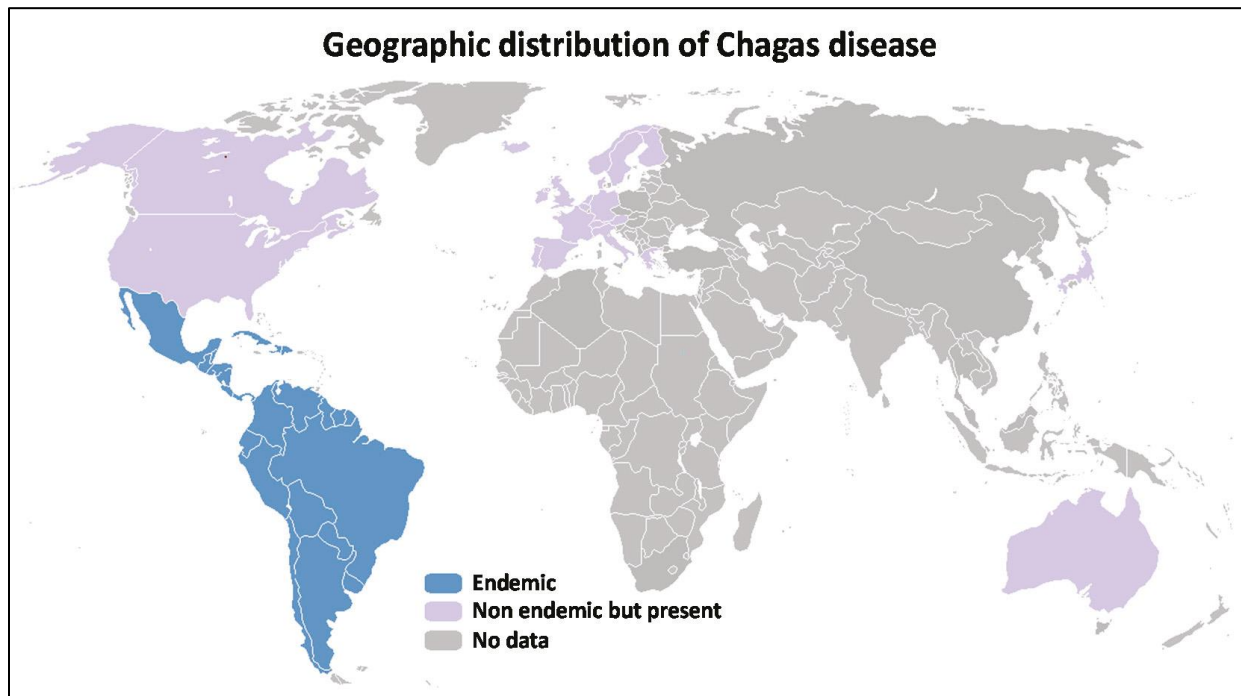
Por otra parte, en el último siglo la EC se ha extendido a otros continentes, debido a la migración de personas infectadas a áreas no endémicas, esto ha llevado a la creciente detección de un gran número de individuos infectados en países como Canadá, Australia, Japón y algunos países

de Europa (Castillo-Riquelme, 2017). En los países del triángulo septentrional de América Central (El Salvador, Honduras y Guatemala) se ha observado un aumento de la pobreza y de los índices de violencia lo que ha ocasionado el incremento de la migración de personas con riesgo de transmitir la EC en EE. UU. (Informe Naciones Unidas, 2017).

En la actualidad, la epidemiología de la EC en EE.UU puede estar cambiando debido a factores como la inmigración continua y la ampliación de los vínculos familiares entre EE.UU y las regiones endémicas de América Latina; el aumento del número de personas que se trasladan a las regiones del sur de EE.UU, lo que significa una mayor invasión del hábitat de los triatomíneos y un mayor contacto entre los seres humanos y los triatomíneos; y el cambio climático, que podría ampliar el rango de hábitat de los vectores triatomíneos (Forsyth et al., 2022) Por tanto, es necesario mejorar la detección de los casos nuevos y existentes con el fin de atender las necesidades sanitarias de las poblaciones afectadas, vigilar estos posibles cambios en la epidemiología de Chagas y establecer medidas adecuadas de mitigación del riesgo. Actualmente, la EC afecta al menos a 300.000 residentes de los Estados Unidos y la prevalencia sigue en aumento (Bern et al., 2019).

Figura 1.

Distribución mundial de la EC.



Nota. Distribución mundial que muestra los países endémicos de la enfermedad de Chagas, donde la transmisión se produce principalmente por la acción de los insectos vectores, así como los países que reciben personas infectadas procedentes de estas regiones debido al proceso migratorio. Adaptado de Chagas Disease. “Funding for Chagas Disease: A 10-Year (2009–2018) Survey” (p. 58), por J. Heukelbach, 2021, *MDPI*.

1.1.3 Agente etiológico (Trypanosoma cruzi)

1.1.3.1 Morfología y ciclo de vida del *Trypanosoma cruzi*. Durante su ciclo de vida, *T. cruzi* es encontrado en tres diferentes formas morfológicas. El estadio **Tripomastigote** se caracteriza por presentar un flagelo que se extiende por todo el borde externo a lo largo de una membrana ondulante, esta es la forma no replicativa e infectante del parásito, dado que esta morfología le confiere la capacidad de invadir activamente diferentes células. **Amastigotes**, estas

formas no presentan flagelo y su forma es redondeada; se multiplican dentro de varios tipos de células, preferiblemente aquellas de origen mesenquimal. Los **Epimastigotes**, son formas replicativas y se encuentran en el intestino del insecto vector.

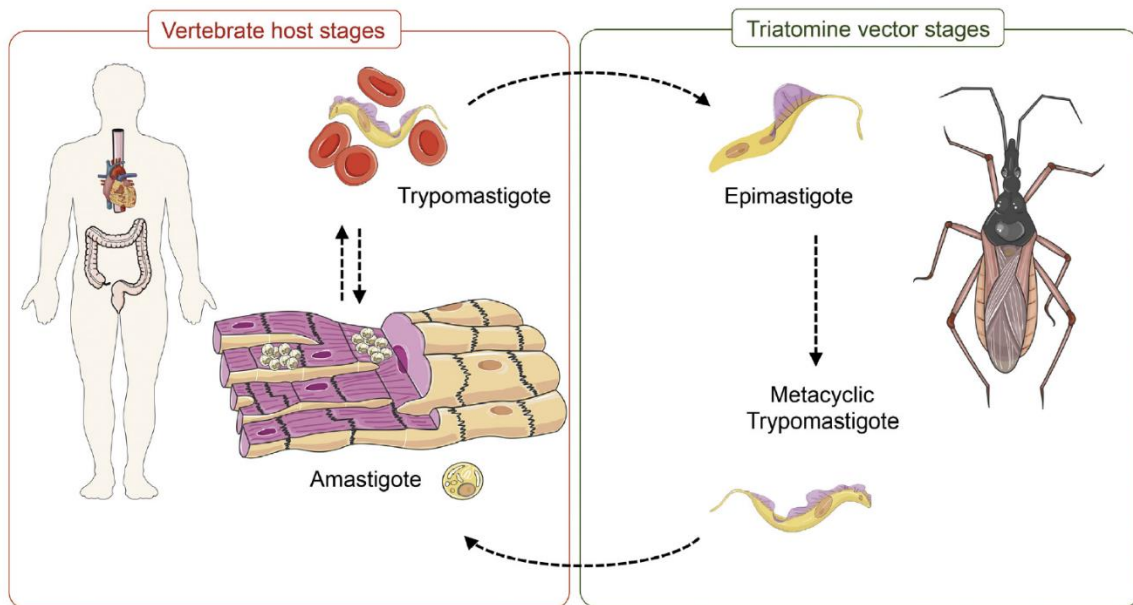
T. cruzi es un organismo digenético que presenta un ciclo biológico que se alterna entre dos tipos de hospederos: **insectos hemípteros** (vectores) y **numerosas especies de mamíferos** (reservorios). En estos últimos, se han identificado más de 150 especies; entre los cuales se encuentran marsupiales, roedores y aves, entre otros. *T. cruzi* es principalmente transmitido a los humanos a través de insectos hematófagos de la familia Reduviidae, existen más de 150 especies de vectores diferentes pertenecientes a 18 géneros distintos (WHO, 2015) y el riesgo de transmisión que supone cada especie de vector está influenciado por la probabilidad de que la especie en cuestión entre en contacto con el ser humano (Bender et al., 2020)

El ciclo de vida del parásito comienza cuando el insecto vector adquiere las formas tripomastigotes a través, de la ingesta de sangre a partir de hospederos vertebrados infectados. Luego los parásitos en el abdomen del insecto se diferencian a epimastigotes, los cuales más tarde se dividen por fisión binaria (Clayton, 2010). Subsecuentemente, los epimastigotes migran hacia el tracto final del tubo digestivo donde ellos se diferencian en tripomastigotes metacíclicos, los cuales serán eliminados junto con las heces del insecto durante la ingesta de sangre. El parásito puede ser inoculado mediante el contacto con la piel no intacta, las mucosas o conjuntivas de un hospedero vertebrado mamífero. Una vez los tripomastigotes ingresan, estos transitan por el flujo sanguíneo y migran hacia diferentes órganos como: hígado, bazo, intestino, ganglio linfático, sistema nervioso, músculo esquelético y cardiaco. Una vez alcanzan el citoplasma de la célula hospedera, los tripomastigotes se diferencian en amastigotes los cuales después de 3 a 5 días de replicación experimentan una nueva diferenciación a tripomastigotes, altamente móviles que lisan

la membrana de la célula hospedera y se liberan para invadir células adyacentes y diseminarse por el sistema linfático y el torrente sanguíneo (Tyler y Engmann, 2001). Cuando los tripomastigotes circulan por sangre periférica, ellos pueden ser captados por los triatominos y perpetuar así el ciclo de transmisión (Figura 2).

Figura 2.

Ciclo de vida del Trypanosoma cruzi.



Nota. Ciclo de vida del *T. cruzi*. Un vector infectado se alimenta de sangre y libera tripomastigotes junto con sus heces cerca del lugar de una herida por picadura o en membranas mucosas (panel de la derecha). Una vez dentro del huésped, los tripomastigotes invaden las células cercanas y se diferencian en amastigotes intracelulares. Los amastigotes se multiplican por fisión binaria en el citoplasma y se diferencian en tripomastigotes, que se liberan en el torrente sanguíneo (panel izquierdo). Adaptado de “Close encounters between *Trypanosoma cruzi* and the host mammalian cell: Lessons from genome-wide expression studies” (p.992), por A. Oliveira, 2020, *Genomics*, 112 (1).

1.1.3.2 Genética del *Trypanosoma cruzi*. *T. cruzi*, es una especie que exhibe alta diversidad genética y fenotípica. Las poblaciones naturales de *T. cruzi* presentan una estructura

genética predominantemente clonal, sin embargo, utilizando las nuevas tecnologías de secuenciación de nueva generación (NGS, por sus siglas del inglés Next Generation Sequencing), se ha evidenciado que *T. cruzi* experimenta meiosis, de manera que, diferentes estrategias reproductivas y tasas de intercambio genético podrían estar ocurriendo de forma simultánea en un solo foco de enfermedad (Schwabl et al., 2019). Por tanto, se estima que en la naturaleza se encuentren diversos genotipos clonales estables de *T. cruzi*. Basados en un número de marcadores bioquímicos y moleculares, las poblaciones de *T. cruzi* han sido divididas en seis **unidades discretas de tipificación** o DTUs que van desde el TCI a TCVI (Zingales et al., 2012). Se han observado diferencias geográficas en cuanto a la distribución de estos genotipos. TCI predomina al norte de Amazonas y Centroamérica mientras las cepas TCII, V y VI tienden a ocurrir más a menudo al sur del Amazonas, en el centro de Brasil y la región del cono sur. Esta distribución parece coincidir con diferentes síntomas de la enfermedad crónica, sin embargo, es claro que todas las cepas podrían causar enfermedad cardíaca pero los genotipos TCII, V y VI parecen estar asociados a síndromes crónicos de órganos como el colon y esófago (Monje Rumi et al., 2020).

1.1.4 Formas de transmisión de la EC

1.1.4.1 Transmisión vectorial. La transmisión vectorial de *T. cruzi* al hombre es considerada como la principal vía de infección. Se inicia por contacto de la piel o mucosas con heces contaminadas con el parásito, provenientes de insectos domiciliados o aquellos con comportamiento intrusivo. Es transmitido en áreas endémicas por varias especies de tres géneros de vectores triatominos (*Triatoma*, *Panstrongylus* y *Rhodnius*). Todos los tres géneros se encuentran ampliamente distribuidos en Latinoamérica, desde México hasta Argentina y Chile y

habitan tanto en áreas boscosas como áridas (Guarner, 2019). Interesantemente, las áreas endémicas para EC se superponen con las áreas de distribución de la mayoría de los insectos de la familia Triatominae (García et al., 2015). En el ciclo selvático, los reservorios mamíferos son mayormente primates, ratones y marsupiales. En el ciclo doméstico, los reservorios son los humanos, perros y gatos. El hallazgo de especies de triatominos intrusivas y de mamíferos con *T. cruzi* en el domicilio y el peridomicilio, así como en los bosques periurbanos, demuestra el riesgo de infección en las poblaciones que habitan en viviendas urbanas adyacentes a los ecotopos donde se mantiene el ciclo silvestre (Reyes et al., 2017).

1.1.4.2 Transmisión por transfusión sanguínea. La EC debida a transfusión sanguínea ha disminuido, gracias a la implementación de estrategias de control de donantes en bancos de sangre en gran parte de los países de Latinoamérica (Coura, 2015). Sin embargo, esta forma de transmisión supone un desafío para los países no endémicos debido a que están recibiendo miles de inmigrantes provenientes de área endémicas quienes portan la enfermedad, por lo tanto, un nuevo escenario para este mecanismo de transmisión ha emergido (Guarner, 2019).

1.1.4.3 Transmisión oral. Después de la implementación de medidas de erradicación para los vectores y el establecimiento de pruebas de rutinas para detectar *T. cruzi* en ensayos de banco de sangre, la ruta oral ha surgido como una forma importante de transmisión. La transmisión ocurre a través de la contaminación de alimentos con heces u orina de triatominos o con las secreciones de las glándulas anales de marsupiales. Así, un didelfido infectado, puede expulsar las formas infectivas con las secreciones de las glándulas odoríferas. Cabe señalar, que algunos casos

EC agudo a través de la ingesta de comida contaminada han sido reportados en regiones donde los triatomos intradomiciliarios y control peri-doméstico ha sido efectivo.

La ruta por transmisión oral fue observada primero en modelos animales en 1913, cuando fue propuesto que los reservorios pudiesen adquirir el parásito a través de la ingesta de insectos contaminados. Finalmente, lo anterior fue confirmado por infecciones experimentales en modelos murinos usando sangre con tripomastigotes, orina y heces de insectos contaminados. En humanos, la transmisión oral de *T. cruzi* ha sido descrita como fuente puntual de brotes en los cuales grupos de personas han compartido una comida o bebidas contaminada durante un evento. Los primeros casos de EC transmitido por ruta oral fueron descritos en Brasil. Sin embargo, otros países como Bolivia, Colombia y Venezuela han reportado brotes (Díaz et al., 2015) siendo, la ciudad de Caracas (Venezuela) el lugar donde se registró el brote más grande de infección dado que involucró 103 casos agudos de EC (Alarcón de Noya et al., 2010).

1.1.4.4 Transmisión congénita. De acuerdo con la OMS, hay 1.124.930 mujeres entre 15 y 44 años infectadas con *T. cruzi* en Latinoamérica y el riesgo de infección congénita por *T. cruzi* en niños nacidos de madres infectadas es alrededor del 5%. En regiones no endémicas, un estudio realizado en España a mujeres Latinoamericanas embarazadas mostró una prevalencia de 11.4% y evidenció infección congénita en 8 recién nacidos (Barona-Vilar et al., 2012).

1.1.4.5 Transmisión a través de órganos. La transmisión a través del trasplante de órganos infectados necesita ser cuidadosamente vigilada dado que la infección por *T. cruzi* puede llegar a ser exacerbada debido al estado inmunosupresión del receptor del órgano. Esta vía de transmisión ha también sido documentada en países no endémicos (Corey et al., 2017).

1.1.5 Historia natural de la Enfermedad de Chagas

La EC evoluciona a través de dos fases: una aguda y una crónica. **La fase aguda**, ocurre por la infección (transmitida por vectores) la cual suele ser leve, sin embargo, en muy raras ocasiones puede llegar a ser fatal y puede durar cerca de dos meses. Cuando se presentan los síntomas, generalmente después de un período de incubación de 1 a 3 semanas, la persona recién infectada puede desarrollar fiebre, escalofríos, náuseas, vómitos, diarrea, erupción cutánea e irritación meníngea. Esta fase puede ocurrir a cualquier edad y cuando el sitio de entrada es la piel, se acompaña de una lesión inflamatoria elevada denominada chagoma. Por otro lado, si el sitio de entrada es cercano al ojo se observa edema periorbitario unilateral (signo de Romagna), otras manifestaciones durante esta fase incluyen conjuntivitis, linfadenopatías y hepatoesplenomegalia. Además, esta fase se caracteriza por alta parasitemia dado que las formas tripomastigotas pueden ser vistas fácilmente en los extendidos de sangre periférica o líquido cefalorraquídeo. La tasa de mortalidad de los pacientes infectados naturalmente y en fase aguda es menor del 2% y en los casos más severos pueden desarrollarse miocarditis aguda y o meningoencefalitis e incluso llevar a la muerte. Al finalizar la fase aguda, la mayoría de las personas infectadas entran a la forma clínica **indeterminada (FI)**. Esta fase comprende un período de duración variable en el que se detecta la presencia de anticuerpos anti *T. cruzi*, pero no se presentan síntomas ni signos clínicos de enfermedad cardíaca o digestiva. Esta fase puede durar meses hasta una vida entera.

Posteriormente, dos a tres décadas, entre un 20 a 30% de los pacientes infectados y en FI progresan hacia una **fase crónica**. Durante este periodo, la mayoría tendrá una enfermedad cardíaca, mientras aproximadamente 5% - 21% de los infectados desarrollará lesiones en el

esófago o el colon (Bierrenbach et al., 2022). Estas lesiones en el esófago o el colon resultan de la pérdida de las células ganglionares y plexos nerviosos y causan dilatación por lo cual, son denominadas megaesófago o megacolon. El megacolon se acompaña de síntomas como disfagia (26%) y regurgitación de los alimentos, mientras la constipación es el síntoma usual observado en el megacolon y en los casos más severos puede complicarse con obstrucción intestinal y llevar a ruptura del tejido, peritonitis y muerte (Gasparim y Gharib, 2018). A pesar, de los esfuerzos por entender el tropismo del parásito por ciertos tejidos, tales como el corazón, esófago o el colon, los factores involucrados en la progresión clínica desde la forma indeterminada a la forma sintomática son aún desconocidos.

Por su parte, la afectación cardíaca, denominada **Cardiomiopatía Chagásica Crónica** (CCC) es la forma más común de la enfermedad y se presenta como una cardiomegalia, caracterizada por anormalidades en el sistema de conducción, arritmias, formación de trombos, miocardiopatía dilatada, falla cardíaca y muerte (Cardoso et al., 2016, Torres et al., 2022). Una de las características distintivas de la CCC es el aneurisma apical del ventrículo izquierdo el cual es observado tanto por imagen cardíaca como autopsia (Nunes MCP et al., 2018). Algunos pacientes también exhiben destrucción del tejido de conducción, más comúnmente bloqueo de rama derecha, que resulta anormalidades de la conducción intra y auriculo ventricular. Los pacientes pueden requerir marcapasos y en los casos más graves pueden estos pacientes beneficiarse del trasplante cardíaco (Bestetti, 2016).

La Asociación Americana del corazón (AHA, por sus siglas en inglés American Heart Association) y el Colegio Americano de Cardiología (CAC, por sus siglas en inglés American College of Cardiology), establecieron en las guías para el diagnóstico y manejo de la falla cardíaca

en adultos, cuatro categorías o estadios (A, B, C y D), de acuerdo con el grado de severidad de la forma cardiaca. Ver tabla 1.

Tabla 1.

Fases y etapas clínicas de la progresión de la enfermedad de Chagas de acuerdo con las guías de práctica clínica del Colegio Americano de Cardiología y la Asociación Americana del Corazón.

Enfermedad de Chagas						
Fase aguda	Fase crónica					
Pacientes infectados con T. cruzi con hallazgos compatibles con enfermedad de Chagas aguda.	Forma Indeterminada	Cardiomiopatía Chagásica Crónica				
	A	B1	Cardiomiopatía Chagásica Dilatada /Falla cardiaca			
	Pacientes en riesgo para desarrollar cardiaca. Estos pacientes tienen serología positiva, no presentan cardiopatía, no hay signos ni síntomas de falla cardiaca y electrocardiograma normal	Pacientes con cardiopatía evidenciada por cambios electrocardiográficos o ecocardiográficos, pero con función ventricular normal sin síntomas ni signos previos de falla cardiaca	con	B2	C	D
				Pacientes con cardiopatía caracterizada por disfunción ventricular global sin signos ni síntomas previos de falla cardiaca	Pacientes con disfunción ventricular y síntomas actuales de falla cardiaca (NYHA I, II, III o IV)	Pacientes con síntomas refractarios de falla cardiaca a pesar de tratamiento clínico óptimo.

1.2 Cardiomiopatía Chagásica Crónica (CCC)

1.2.1 Generalidades de la CCC

La CCC es la manifestación clínica más importante de la EC y se caracteriza por su rápida progresión hacia falla cardiaca y mayor mortalidad, por lo que representa la principal causa de

muerte de los pacientes con EC. Se presenta en un 10% a un 30% de las personas infectadas en cerca de 23 países de Latinoamérica. Aunque generalmente es clasificada como cardiomiopatía dilatada debido a su patrón hemodinámico, la distribución típica de la fibrosis en las regiones posterior y apical del ventrículo izquierdo, así como las alteraciones en el sistema de conducción eléctrica y el nodo sinusal, permiten distinguir la EC de otras cardiomiopatías (González-Zambrano, 2020).

1.2.2 Manifestaciones Clínicas de la CCC

Los síntomas de la CCC resultan de anomalías en el sistema de conducción, de la disfunción contráctil miocárdica, arritmias y fenómenos de tromboembolismo.

- **Arritmias:** la EC es considerada una cardiomiopatía arritmogénica caracterizada por arritmias auriculo-ventriculares y una amplia variedad de anomalías del sistema de conducción eléctrica. La característica más importante de la arritmia en la miocardiopatía Chagásica, desde el punto de vista electrofisiológico, es la gran diversidad de circuitos de reentrada (50% epicárdicos), que favorecen el desarrollo de taquicardias. Los siguientes factores anatómo-electrofisiológicos causantes de la arritmia:

1. Fibrosis miocárdica extensa entremezclada con focos de inflamación miocárdica y miocitolisis secundaria a isquemia microvascular.

2. Anomalías de la contracción regional, sobre todo antero-basal y apical.

3. Aneurismas ventriculares, principalmente apicales, en ocasiones rodeados de zonas isquémicas o fibróticas.

4. Zonas de conducción lenta en áreas de cicatrices miocárdicas, que propician la formación de microreentradas.

5. Alteraciones de las uniones intercelulares miocárdicas y en la continuidad intercelular a través de los discos intercalares.

Posteriormente a la fase aguda de infección tripanosómica, el miocardio con inflamación, fibrosis y con alguna zona aneurismática, puede encontrarse en situación estable, observándose extrasístoles ventriculares, pero una vez desestabilizado por factores como: falla hemodinámica, acidosis, hipoxia, trastorno hidroelectrolítico, disfunción autonómica, sobreestimulación simpática, puede desarrollarse arritmias ventriculares graves como taquicardia ventricular sostenida (TVS) e incluso fibrilación ventricular.

Otros signos frecuentes son: el bloqueo A-V, más el bloqueo completo de rama derecha, con o sin hemibloqueo anterior izquierdo, los cuales son sugerentes de esta patología. Puede haber bloqueo AV completo, fibrilación auricular, bloqueo completo de rama izquierda y extrasístoles ventriculares. La evolución de la cardiopatía es hacia insuficiencia cardiaca. En corazones dilatados, se presentan fenómenos tromboembólicos que pueden ocasionar infartos pulmonares y cerebrales. Existe fibrosis cardiaca que origina aneurismas de la punta del ventrículo izquierdo. La progresión de la cardiopatía Chagásica a la insuficiencia cardiaca es de alrededor de un 24,8% y de las complicaciones es de un 3,5% en pacientes tratados y de 16,9% en los no tratados (Franco Paredes et al., 2007).

- **Falla cardiaca (FC):** La FC se considera un síndrome clínico multifacético producto de la disfunción cardiaca que resulta en la incapacidad de bombear sangre en la cantidad necesaria para suplir la demanda metabólica del organismo, lo cual conduce a alteraciones en varios órganos,

tal como el riñón, donde se observa retención de agua y sodio, en el tejido músculo esquelético, causa fatiga y en el cerebro causa reducción en el nivel de consciencia.

La FC también se caracteriza por alteraciones estructurales adversas tales como: incremento en la masa ventricular izquierda, hipertrofia del cardiomiocito y fibrosis miocárdica. Estas anomalías provocan un gasto cardíaco reducido, aumento de la presión venosa y un deterioro progresivo del corazón. El síndrome de FC puede ser causado por una gran variedad de enfermedades entre ellas: enfermedad isquémica, hipertensión pulmonar, hipertensión sistémica, anormalidades en el músculo cardíaco o en el tejido valvular y finalmente puede deberse a causas de tipo infeccioso como es el caso de la EC.

Tabla 2.

Principales factores etiológicos en la falla cardíaca.

Causas Predisponentes	Concepto	Ejemplos
Etiológicas	Estas causas incluyen alteraciones estructurales, congénitas o adquiridas. Indicadores asociados a una mayor probabilidad de FC.	Enfermedad de las arterias coronarias, enfermedad cardíaca congénita
Probablemente etiológicas	Se asocian a una mayor incidencia de falla cardíaca sin una relación causal demostrada	Hipertensión arterial, diabetes, historia de fiebre reumática
No etiológicas	Estos factores no tienen una relación causal directa con FC, son indicadores de riesgo.	Edad, sexo masculino, obesidad, fumador
Causas Determinantes		
Cardiomiopatía	Primaria	Son aquellas que alteran los mecanismos reguladores de la función ventricular
	Secundaria	
		Cardiomiopatía dilatada, hipertrófica, cardiomiopatía restrictiva Isquémica, infecciosa (Enfermedad de Chagas), tóxica (alcohol) y

Causas Predisponentes		Concepto	Ejemplos
Sobrecarga ventricular	Presión	Causadas por sobrecarga hemodinámica	cardiomiopatía metabólica (diabetes mellitus)
	Volumen		Hipertensión, estenosis pulmonar, hipertensión pulmonar
Llenado ventricular alterado		Ocasionadas por déficit en el llenado ventricular	Insuficiencia valvular, derivaciones
Arritmias		Ocasionan alteraciones de la tasa cardiaca	Hipertrofia ventricular, estenosis tricúspide, tumores, taponamiento cardiaco
Causas Precipitantes			
Cardiacas		Factores que causan descompensación en una situación estable en pacientes con o sin diagnóstico previo de FC.	Bradicardia, taquicardia
No cardiacas		Pueden ser infecciones respiratorias, medicamentos que causan retención de sodio	Arritmias, cardiomiopatía isquémica, beta bloqueadores
			Infecciones, embolismo pulmonar, anemia, esfuerzos, medicamentos (AINES)

Nota. AINES, drogas con efecto antiinflamatorios no esteroideos. Tomado de: Heart Failure: Etiology and approach to diagnosis. Por J Segovia, 2004. Revista Española de Cardiología, pag 80.

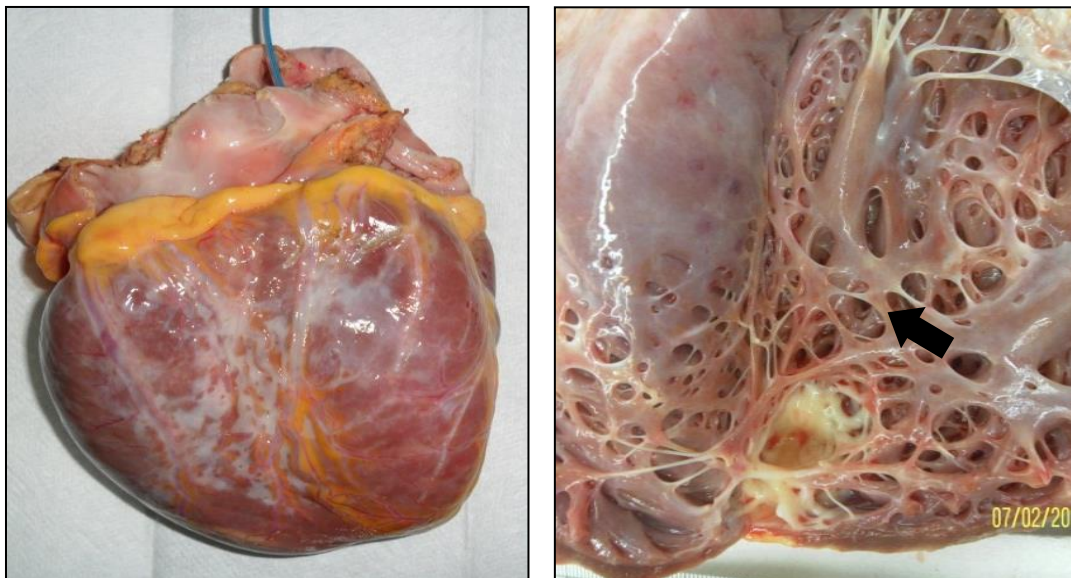
Tromboembolismo: una de las complicaciones principales de la EC son los episodios de tromboembolismo y fenómenos de tromboembolismo periférico. Estudios realizados en autopsias de pacientes con EC mostraron que un 44% de los pacientes presentó fenómenos tromboembólicos o trombos intracardiacos (Aiello, 2015). La trombosis intraventricular es más frecuente entre los estadios finales de la cardiomiopatía y se ha asociado con el desarrollo de aneurismas y con insuficiencia cardiaca (Oliveira, 1983).

1.2.3 Patología de la CCC

1.2.3.1 Aspectos macroscópicos de la CCC. Durante la CCC se observan determinadas características macroscópicas en la morfología cardíaca dentro de las cuales se destacan: adelgazamiento de las paredes ventriculares, ventrículos agrandados y dilatados, cardiomegalia, trombosis intracavitaria y/o tromboembolismo periférico (Kransdorf et al.,2016). En la Figura 3, se observa mayor detalle de las lesiones a nivel macroscópico.

Figura 3.

Características macroscópicas de la CCC.

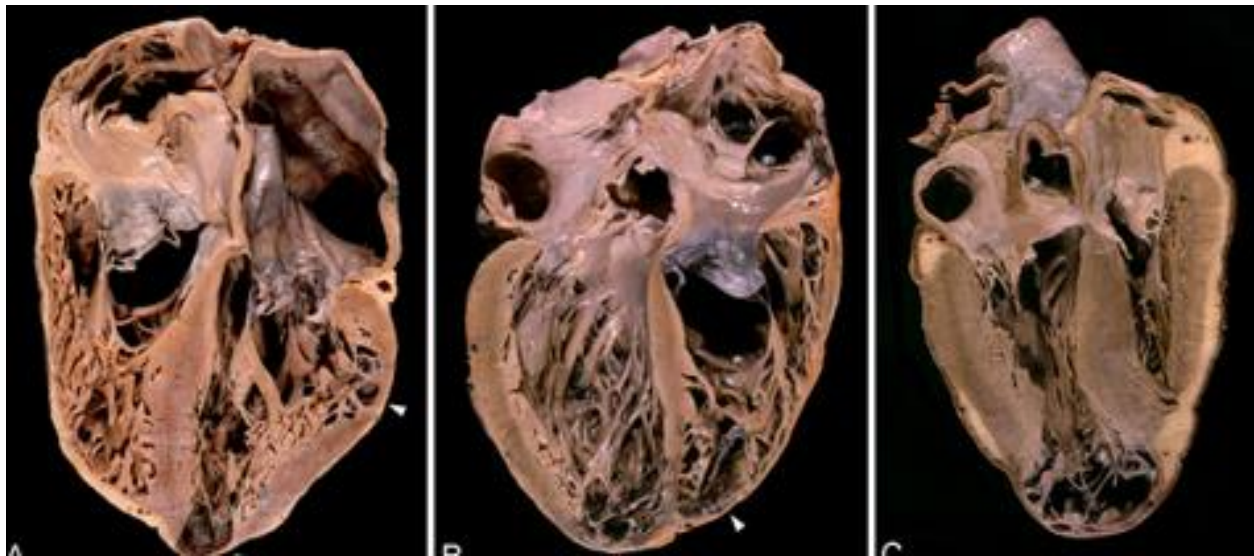


Nota: Hallazgos macroscópicos de la cardiomiopatía chagásica crónica. A) Fibrosis epicárdica representada por áreas difusas de aspecto blanquecino. B) Dilatación de la cámara ventricular izquierda, la flecha señala el típico aneurisma apical.

-Adelgazamiento parietal: esta lesión corresponde a áreas o zonas de las paredes ventriculares libres que presentan una reducción importante de su espesor (Figura 4). En el

ventrículo izquierdo, el adelgazamiento parietal es abrupto con relación a las áreas vecinas y se localiza frecuentemente en la zona apical. El espesor puede alcanzar entre 1 a 4 mm y 2.5 a 4 cm de extensión y está formado por tejido fibroso. El adelgazamiento puede adquirir la forma aneurismática cuando hace protrusión externa a manera de saco. A ese nivel, la pared está casi totalmente constituida por tejido fibroso con o sin infiltrado inflamatorio (Santacruz, 2021).

-Cardiomegalia: un hallazgo común y constante durante la CCC es el aumento de tamaño del corazón por causa de la dilatación de las cavidades y el aumento de peso debido a la hipertrofia ventricular (Figura 4). La **hipertrofia** del músculo cardiaco se expresa con el aumento de peso que varía entre 400 a 700 g en la fase crónica y es la consecuencia del daño de la fibra y del intersticio miocárdico. A nivel celular se observan alteraciones características como necrosis, inflamación e incremento de la masa muscular cardiaca por hipertrofia celular. Según Postani y colaboradores, los cardiomiocitos no sólo se hipertrofian, sino que se multiplican (**hiperplasia celular**) como respuesta a la infección, por lo tanto, favorece el proceso de remodelación cardiaca (Postani et al., 1999).

Figura 4.*Patología macroscópica de la cardiomiopatía chagásica crónica*

Nota: En la figura se observa cortes frontales A) Cardiomegalia con aneurisma apical izquierdo (flecha). Hipertrofia del miocardio. Se observa un marcado adelgazamiento en el borde obtuso del corazón en la zona submitral (cabeza de flecha). B) Cardiomegalia. Adelgazamiento y trombosis en los ápices de ambos ventrículos (cabezas de flecha) C). Se aprecia claramente la hipertrofia de la pared libre del ventrículo derecho, salvo un marcado adelgazamiento del vértice. Adaptado de “Coronary microvascular disease in chronic chagas cardiomyopathy including an overview on history, pathology, and other proposed pathogenic mechanisms.” (p.e674), por M. Rossi, 2010, *PLoS Neglected Tropical Disease* 4(8).

En la fase terminal, el músculo se torna muy flácido por lo que el corazón toma la forma de globo. Se puede concluir que la cardiomegalia durante la CCC es la expresión de un daño subcelular, celular y tisular progresivo y lento el cual tarda años en manifestarse clínicamente. Por otro lado, la hiperplasia se debe a factores tisulares y moleculares que estimulan la división celular.

-Trombosis y tromboembolismo periférico: En un estudio post-mortem realizado en Sao Paulo Brasil con 1.345 casos estudiados de cardiopatía de Chagas, se encontró en el 44% de los casos un fenómeno tromboembólico que incluía infarto en diferentes fases de evolución y

trombosis cardíaca en el 27% de los casos (Samuel et al., 1983). Así mismo, la trombosis cardíaca es un fenómeno frecuente observado en la fase final de la CCC y se encuentra generalmente en las zonas de adelgazamiento, específicamente en la zona apical del ventrículo izquierdo. Otras localizaciones son el endocardio de la aurícula derecha, el ventrículo derecho y la aurícula izquierda. El 35% de los pacientes con CCC que fallecieron debido a falla cardíaca presentaron trombos intramurales.

Al parecer varios cambios estructurales y funcionales ocurren en la microvasculatura, lo cual podría luego accionar los mecanismos usuales de reparación y la consecuente fibrosis. El edema endotelial, perivasculitis, microaneurismas y trombos de fibrina así como, incremento del tono vascular, cambios en la perfusión miocárdica y estimulación de la agregación de plaquetas podrían estar causando la agresión al endotelio y causar la aparición de vasoespasmos y trombosis microvascular coronaria, lo cual causa daño miocárdico (Salomone, 2003).

1.2.3.2 Alteraciones microscópicas en el compartimento no miocítico. Desde el punto de vista histopatológico, la CCC se caracteriza por la presencia de abundante **infiltrado inflamatorio** y por **remodelamiento de la matriz extracelular**, estos cambios se observan generalmente en el miocardio del ventrículo izquierdo y en las aurículas. El infiltrado inflamatorio es distribuido de forma multifocal, es decir tanto en el músculo de trabajo cardíaco como en las áreas del sistema de conducción. El infiltrado inflamatorio se extiende a las zonas vecinas del pericardio y endocardio en todas las paredes cardíacas (Bonney et al., 2019).

-Infiltrado inflamatorio: El tipo de infiltrado inflamatorio es mononuclear constituido por linfocitos TCD4+ y CD8+, monocitos, macrófagos, eosinófilos y mastocitos. Cabe señalar, que la

presencia de eosinófilos activados en los casos más severos de miocarditis agrava la lesión de los miocitos por acción de la toxina eosinofílica.

En relación con el proceso de remodelamiento éste se refleja principalmente en el compartimento extracelular y se expresa como fibrosis, la cual constituye la fase final o cicatricial del proceso inflamatorio, bajo las formas de fibrosis reactiva; endomisial, perimisial, perivascular y fibrosis reparativa en parches sustitutivos de miocardio degenerado, atrófico, apoptótico o necrótico. La fibrosis endomisial está relacionada con el engrosamiento de las membranas basales tanto de los cardiomiocitos como de los capilares intramiocárdicos, la cual ha sido demostrada desde hace más de una década. En varias áreas del miocardio, la fibrosis es predominantemente subepicárdica o subendocárdica y se acompaña eventualmente de trombosis. Las bandas de tejido de colágeno perimisial envuelven islotes de fibras miocárdicas con atrofia y evidentes cambios degenerativos y escaso infiltrado inflamatorio. En las zonas de adelgazamiento parietal la fibrosis es confluyente y más densa pudiendo no contener fibras cardíacas ni infiltrado inflamatorio y no se encuentran nidos de parásitos.

1.2.4 Aspectos clínico-patológicos de la CCC

Las características morfológicas y funcionales del corazón de pacientes con CCC dependen de la fase clínica de la enfermedad. Tres etapas clínicas se han definido durante la fase crónica y son: etapa I, II y III.

-Etapa clínica I: esta fase puede durar décadas, su comienzo y término es indefinido. Ha sido denominada indeterminada o fase asintomática. El tamaño y peso del corazón es normal con

una función sistólica normal. Pueden existir anormalidades tempranas únicas o múltiples de la función diastólica, sin embargo, no se evidencia dilatación de las cavidades ni hipertrofia.

-Etapa clínica II: aunque esta fase puede ser también asintomática puede acompañarse de manifestaciones clínicas más evidentes y progresivas como: bloqueo avanzado de rama derecha, hemibloqueo anterior izquierdo, arritmia extra sistólica, arritmias supraventriculares y ventriculares con un corazón de tamaño normal y electrocardiograma anormal.

-Etapa clínica III: Generalmente en esta etapa ya existe cardiomegalia, trombosis intracardiaca y tromboembolismo periférico. Clínicamente suele haber insuficiencia cardiaca congestiva y alteraciones electrocardiográficas como bloqueo de rama del haz de His o completo, arritmias ventriculares complejas, ondas Q anormales y función sistólica disminuida. La fracción de eyección suele ser menor del 30% y se evidencian anormalidades graves de la contractilidad parietal cardiaca y disfunción autónoma y diastólica.

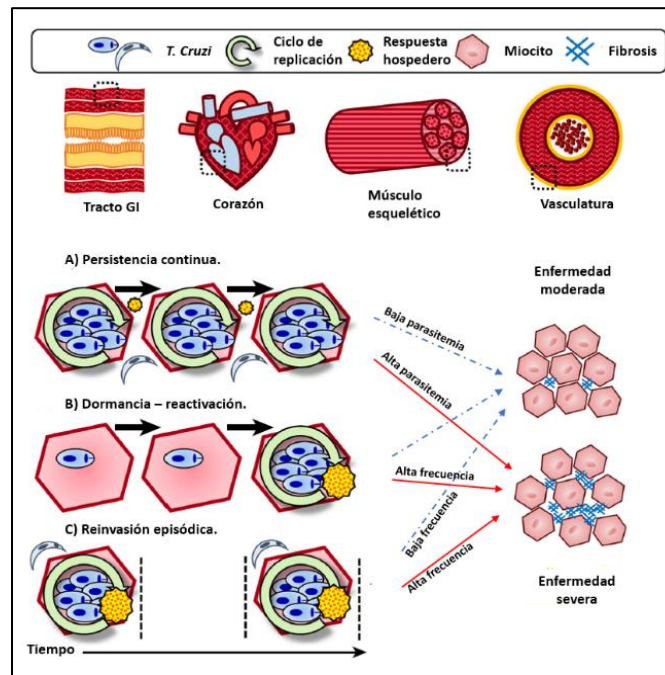
1.2.5 Mecanismos de la patogénesis de la CCC

La patogénesis de la CCC es muy compleja y aún no está completamente entendida. La evidencia recolectada a través de estudios en modelos animales y en humanos ha determinado que son cuatro los mecanismos patogénicos que explican el desarrollo de la EC, dos mecanismos primarios y dos secundarios. En cuanto a los mecanismos primarios se consideran consecuencias de la respuesta inmune la cual es modulada por la presencia persistente del parásito en el tejido y por la autoreactividad del hospedero. Los secundarios involucran procesos de disautonomía cardiaca y alteraciones microvasculares (Nunes et al., 2018).

1.2.5.1 Persistencia del parásito en el tejido. Los estudios histopatológicos en la fase crónica de la enfermedad muestran muy bajo grado de parasitismo en la fibra miocárdica y un fenómeno intrigante, es el hecho de que no se ha observado una correlación topográfica entre el infiltrado inflamatorio y los nidos de amastigotes. Cabe señalar, que esas observaciones fueron obtenidas a partir de técnicas histológicas las cuales no son lo suficientemente sensibles para detectar el número escaso de parásitos en el tejido. En ese sentido, usando técnicas moleculares más sensibles y precisas como PCR en tiempo real (qPCR) y métodos de hibridización *in situ*, se han detectado antígenos o DNA genómico del parásito en los focos inflamatorios, lo cual ha llevado a un mejor entendimiento de la dinámica de la infección, dado que puede variar sustancialmente entre diferentes tejidos y el tiempo e incluso; puede variar entre individuos infectados. De esta manera, podría pensarse que son múltiples, los factores que apoyan esta heterogeneidad, incluyendo la diversidad genética del hospedero y el linaje genético del parásito infectante (Lewis y Kelly, 2016). La hipótesis de la persistencia del parásito emergió como un mecanismo potencial para explicar el daño del tejido y establece que “la persistencia de *T. cruzi* en sitios específicos en el hospedero infectado, resulta en una reactividad inflamatoria crónica”. La respuesta inmune del hospedero claramente limita el nicho dentro del cual el parásito puede persistir, sin embargo, el mecanismo de evasión inmune a largo plazo dentro del hospedero individual aún no se conoce. Diferentes modos de persistencia pueden ocurrir dentro y entre órganos, incluyendo: bajo nivel de infección y éste con carácter permanentemente continuo en el tiempo, procesos de reactivación-dormancia y re-invasión específica (Laucella et al., 2001) (Figura 5).

Figura 5.

Mecanismos de la persistencia de T. cruzi en el hospedero mamífero.



Nota. Modos de persistencia del parásito *T. cruzi* durante infecciones a largo plazo. Adaptado de “Putting Infection Dynamics at the Heart of Chagas Disease” (p.901), por M. Lewis y JM Kelly, 2016, *Trends in parasitology*.

1.2.5.2 Autoinmunidad. La autoinmunidad inducida por *T. cruzi* ha sido objeto de investigación desde hace años, sin embargo, su papel en la patogénesis y los mecanismos por el cual ésta se desarrolla aún no están claramente entendidos. Los mecanismos esenciales por los cuales la infección con *T. cruzi* podría resultar en un fenómeno de autoinmunidad son: el daño del cardiomiocito inducido por el parásito y el mimetismo molecular entre epítopes muy similares del parásito y del hospedero. En el primer caso, la infección provoca una activación de los linfocitos T no específicos debido a una ruptura del cardiomiocito, lo que ocasiona que se libere gran cantidad de antígenos propios, los cuales podrían desencadenar una respuesta inmune tanto específica como inespecífica favorecida por el ambiente proinflamatorio (INF γ y ON). Este tipo de respuesta se

denomina activación “por espectador” y consiste en la activación de linfocitos T autorreactivos que no son específicos del agente infeccioso y que responden a segundas señales generadas como consecuencia del daño tisular accionado por el parásito. Este fenómeno está acompañado de una pérdida de la tolerancia de los linfocitos T frente a los autoantígenos.

Una serie de reportes publicados a comienzos de la década del 2000 al 2010, describen repuestas combinadas de células T autorreactivas y de anticuerpos específicos para la miosina cardíaca demostrando estos hallazgos que el mimetismo molecular y la ruptura de la tolerancia a autoantígenos cardíacos podría traducirse en una autoinmunidad potencialmente patógena (Iwai et al., 2005). Blancos potenciales para anticuerpos con reactividad cruzada en el suero de pacientes con EC y animales infectados fueron identificados como: proteína ribosomal, receptores unidos a la proteína G, proteínas neuronales y una nueva proteína del hospedero denominada proteína “Cha” (Gironés et al., 2001).

Por otra parte, estudios recientes han relacionado la presencia de linfocitos doble positivos (DP) con procesos de autoinmunidad en la EC. Esta población se caracteriza por la expresión simultánea de receptores CD4+ y CD8+, además, por su localización exclusiva en el timo y por constituir la subpoblación de células precursoras de los timocitos simples positivos (SP). Las células DP han sido descritas en la sangre periférica de individuos saludables, en individuos con enfermedades infecciosas, autoinmunes y con desórdenes inflamatorios crónicos (Savino, 2006). Evidencia reciente ha mostrado presencia de estas células DP en sangre periférica de pacientes chagásicos crónicos tanto en fase IND como los que padecen miocarditis crónica, lo anterior, cuando se comparó con los individuos saludables (Giraldo et al., 2011).

1.2.5.3 Disautonomía cardíaca. En la CCC existe un “síndrome disautonómico”, asociado al compromiso miocárdico. Los primeros estudios anatomopatológicos realizados en necropsias de pacientes chagásicos agudos, revelaron la existencia de parasitismo neuronal cardíaco asociado con periganglionitis y anormalidades degenerativas en las células de Schwann y fibras nerviosas. Estudios subsecuentes demostraron que la despoblación neuronal parasimpática no es específica de esta enfermedad, pero es más severa y evidente en los pacientes chagásicos. La pérdida neuronal en EC ocurre predominantemente durante la fase aguda de la infección. Por lo tanto, son tres los mecanismos propuestos del daño neuronal autonómico: la interacción directa del parásito con los tejidos del huésped, el daño inflamatorio perigangliónico, y la reacción autoinmune anti neuronal. Estas interacciones están influenciadas por la genética del parásito y del huésped, pudiendo determinar la resistencia a la infección o alteraciones en la respuesta efectora y autoinmunidad.

Cabe señalar, la disfunción autonómica desempeña una acción importante en la génesis de muerte súbita ya que la inervación no uniforme del corazón del paciente chagásico puede resultar en una dispersión mayor de la refractariedad ventricular, la cual puede originar arritmias ventriculares graves. La disautonomía generaría bradicardias extremas y efectos sobre la conducción cardíaca, que muchas veces es responsable de la aparición de cuadros sincopales y muerte súbita.

1.2.5.4 Alteraciones microvasculatura. Varias evidencias patológicas, experimentales y clínicas muestran alteraciones estructurales y funcionales de la microvasculatura, estos cambios en principio inducen inflamación perivascular y más tarde, desencadenarían procesos de reparación y fibrosis, llevando a **isquemia y necrosis focal**. Estudios previos, han reforzado la idea de que existen vasodilatación y vasoconstricción anormales a nivel microcirculatorio. Esta

podría ser la base de la distribución focal de la necrosis y la subsecuente fibrosis intersticial reparativa que se encuentran tanto en las lesiones cardiacas humanas como en modelos experimentales de isquemia y reperfusión.

En modelos animales, la presencia de edema endotelial, perivasculitis, microaneurismas y trombos de fibrina en el interior vascular son hallazgos comunes. Además, el aumento del tono vascular y estimulación de la agregación plaquetaria. Se ha demostrado, que existe un aumento en la generación de tromboxano A₂ y de otras sustancias inflamatorias con propiedades protrombóticas como la IL-1 β . En humanos, las alteraciones de la microvasculatura coronaria, disfunción endotelial aumento de la actividad plaquetaria, microtrombos y espasmos son evidentes en los estudios anatomopatológicos. También, se encuentran alteraciones en la perfusión miocárdica lo que da lugar a lesiones como el aneurisma.

1.2.5.5 Estructura y organización de la fibra miocárdica. La organización de la fibra juega un papel en arritmogenesis dado que la estructura de las fibras miocárdicas cumple un papel crítico en la propagación del impulso eléctrico y la producción de la fuerza. El miocardio está constituido por tres principales capas o haces de fibras de cardiomiocitos en el corazón, las cuales se orientan de forma oblicua entre sí y se unen en el ápice del corazón. La propagación eléctrica miocárdica es anisotrópica, es decir, la corriente se propaga en dirección del eje más largo y grande de la fibra.

Los tripomastigotes deben pasar a través de las láminas basales y las capas de la matriz extracelular (MEC) del miocardio y la capa de la matriz intersticial entre las láminas basales para alcanzar los miocitos. Estudios tanto en modelos experimentales y en pacientes chagasicos demuestran que el daño miocárdico resulta de la infección y de múltiples lesiones como isquemia,

inflamación, stress oxidativo y necrosis, los cuales contribuyen a la degradación de la matriz extracelular. Además, las *metaloproteinasas cardiacas* están sobreexpresadas en el escenario de la infección y su inhibición disminuye la inflamación miocárdica (Medeiros et al., 2017). Así, la degradación de la matriz extracelular gradualmente resulta en el deslizamiento de las capas ventriculares, convirtiéndose en el evento primario de la formación del **aneurisma apical** el cual ha llegado a ser una lesión frecuentemente observada en los pacientes con CCC.

Así, el **remodelamiento del corazón en la CCC** es un resultado de la reorganización en la pared cardiaca resultante del daño tisular de la isquemia, necrosis, inflamación y el aumento de la presión intracavitaria, asociada con hipertrofia y dilatación de los ventrículos. La examinación histológica del corazón revela miocitolisis, mionecrosis y necrosis resultante de la hipoperfusión seguido por periodos de reperfusión, el cual puede ser el resultado del vasoespasmo de las ramas de la circulación coronaria.

Histológicamente, el miocardio muestra una miocarditis difusa con infiltrado inflamatorio focal y daño en la fibra cardiaca, prominente fibrosis y escasos parásitos de *T. cruzi* (Cunha Neto et al., 2014). El infiltrado inflamatorio de las lesiones miocárdicas está compuesto principalmente de células T que muestran un perfil de citocinas Th1 y macrófagos. Entre las citocinas aumentadas durante la fase severa de la CCC se encuentran $INF\gamma$, $TNF\alpha$ e IL-6 (Abel et al., 2001). La inflamación miocárdica crónica puede ser secundaria al reconocimiento de antígeno o parásito detectado en los corazones tanto de pacientes con CCC y asintomáticos (Añez et al., 1999) o antígenos miocárdicos. Así mismo, se acompaña de alta grado de parasitemia y parasitismo en el tejido que resulta en inflamación del miocardio, el tracto gastrointestinal, meninges y tejido nervioso periférico y central. En el contexto de la CCC en el cual la persistencia del parásito conduce a incesante inflamación (Tarleton, 2001) con deterioro y un efecto nocivo cascada de

metabolismo, inflamatorio, neuro-humoral y estructural se producen alteraciones en el ventrículo izquierdo, lo que conduce a un remodelamiento adverso y eventualmente disfunción contráctil y falla mecánica de la bomba.

1.2.6 Respuesta Inmune durante la CCC

1.2.6.1 Respuesta inmune durante la fase aguda de la EC. El mecanismo preciso por el cual se activa inicialmente el sistema inmune innato en los humanos en presencia de *T. cruzi* no se conoce completamente. Es sabido que algunos patrones moleculares de *T. cruzi* son reconocidos por receptores específicos conocidos como receptores de reconocimiento de patrones (PRRs). Varios autores han demostrado que los receptores TLR cumplen un papel crítico en la resistencia del hospedero a la infección por *T. cruzi* (Esper et al., 2015). Los neutrófilos expresan TLR-1,2,4,5,6,7,8, y 9. Por su parte, *T. cruzi* puede invadir células profesionales fagocíticas, así como diferentes células no fagocíticas dado que emplea una gran variedad de moléculas y estrategias para internalizarse rápidamente y evadir la respuesta inmune del hospedero. Secuencias de DNA CpG, RNA, proteínas de superficie como la flagelina y mucinas del tipo glicosilfosfatidil inositol (GPI) y glicosil inositol fosfolípidos (GPIIb/IIIa), son algunas de las moléculas que al ser reconocidas por diversos receptores tipo Toll (TLR-9, TLR-2 y TLR-4), tirosin quinasa y receptores del factor de crecimiento epidérmico y transformante, facilitan la rápida invasión del parásito. Una vez internalizados en la fagolisosoma, estos escapan al citoplasma donde inician su replicación. Como resultado de esta interacción, se induce en el macrófago, células dendríticas y células NK la producción de mediadores proinflamatorios como quimoquinas, citocinas (IL-12, TNF- α) y especies reactivas de oxígeno (ROS) (Shoda et al., 2001). Los macrófagos y células dendríticas

que han endocitado el parásito subsecuentemente activan una fuerte respuesta de células T y anticuerpos contra *T.cruzi*.

En cuanto a las **células NK** son consideradas una población celular encargada de evitar la diseminación de la infección. El mecanismo clásico propuesto para la fase aguda de la infección involucra la activación de la síntesis de IL-12 por parte de los macrófagos, la cual induce la síntesis de INF γ por las células NK (Gazzinelli et al., 1993). Esta citocina a su vez inducirá en el macrófago la producción de IL-12, TNF- α y óxido nítrico, contribuyendo así a la eliminación del parásito. De esta forma, las células NK constituyen una fuente importante de INF- γ antes del desarrollo de la inmunidad mediada por las células T y es un hallazgo característico durante la infección crónica con *T. cruzi* (Vitelli Avelar et al., 2006). La fase tardía de la forma aguda está caracterizada por un incremento selectivo de las células NK (CD16+CD56-), este fenotipo se caracteriza por presentar pérdida de la función en esta fase de la enfermedad.

Es importante señalar que la activación descontrolada de los monocitos y las células NK, podría conducir a daño del tejido y al desarrollo de enfermedad crónica severa. Por esta razón, el establecimiento de mecanismos inmunoreguladores en esta fase serán determinantes para controlar la actividad inmune y prevenir los efectos deletéreos asociados con la excesiva estimulación del sistema inmune. En este contexto, el ambiente de citocinas producido por estas células podría representar un importante mecanismo regulador. El análisis del perfil de citocinas antiinflamatorio de las células NK y monocitos circulantes ha sido previamente reportado (Vitelli Avelar et al., 2006). En este estudio se encontró un ligero incremento en los monocitos IL-12+ y un número equivalente de monocitos TNF- Il-10+ así como células NK IL-4+, TNF α -, INF γ - con lo cual se demostró que el perfil de citocinas ex vivo de monocitos y NK durante la fase aguda tardía se pareció al patrón observado en el grupo control (niños no infectados y saludables).

La respuesta inmune durante la fase aguda también involucra la activación de linfocitos Th1 y LT CD8+ los cuales contribuyen a eliminar los amastigotes intracelulares en el tejido infectado. Por otra parte, de forma simultánea, los antígenos del parásito estimulan un perfil Th2 el cual contribuye a la producción de anticuerpos específicos. Lo anterior se evidencia por los hallazgos de poblaciones CD4+ y CD8+ en biopsias endomiocárdicas. Ahora bien, las células T específicas de *T. cruzi* productoras de INF γ migran a los sitios como el miocardio en respuesta a un gradiente de quimoquinas y presencia del parásito. Por otra parte, Silva et al., observó en modelo murino que el número de LTCD8⁺ INF γ ⁺perforina⁺ se correlacionó con daño a los 120 días post infección. Datos recientes muestran que IL17 y las células T reg CD4⁺CD25⁺GITR⁺Foxp3⁺ controlan la miocarditis inducida por el parásito y la resistencia a la infección por *T. cruzi* en ratones (Cai et al., 2016).

Durante la fase aguda de la infección por *T. cruzi*, se observan células secretoras de inmunoglobulinas (Ig) tanto en el bazo como en los nódulos linfoides periféricos y la mayoría de las células B activadas secretan anticuerpos no específicos. En esta fase de infección en ratones se presenta proliferación policlonal del linfocito B caracterizada por un perfil típico de IgG2a e IgG2b (Michailowsky et al., 2003).

En resumen, durante la fase aguda de la infección la respuesta inmune celular dada por los niveles aumentados de IL6 y TNF α ⁺ e INF γ ⁺ por parte de las células mononucleares y posiblemente la respuesta inmune humoral controlan la replicación y el desarrollo del parásito, mientras que las células T reguladoras cumplen un papel muy importante en el control de la respuesta inflamatoria. Sin embargo, ambos tipos de respuesta fallan en la capacidad para eliminar totalmente el parásito. Cabe señalar, que la transición de la fase aguda a la fase crónica está acompañada por una marcada disminución de la parasitemia debido a la respuesta inmune

relativamente efectiva, la cual mantiene el número de parásitos por debajo de los niveles detectables.

1.2.6.2 Respuesta inmune durante la fase crónica de la EC

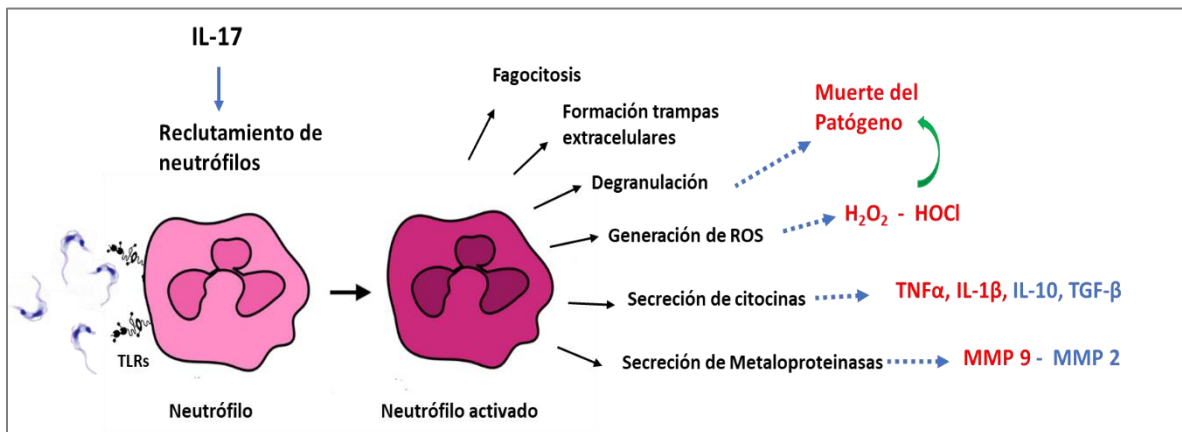
1.2.6.2.1 Fase indeterminada (IND). luego de la fase aguda los individuos entran a la fase IND, la cual se caracteriza por niveles detectables de anticuerpos específicos y la ausencia de daño evidente en el tejido o disfunción orgánica. Esta etapa puede durar desde meses hasta una vida entera. Los mecanismos subyacentes a la transición de la fase asintomática (IND) a una clínicamente sintomática no son aún muy claros. Finalmente, es importante mencionar que otros factores como: el tipo de cepa del parásito, la carga parasitaria, la presencia o ausencia de reinfección y la calidad de la respuesta inmune del hospedero, así como la susceptibilidad genética podrían constituir aspectos determinantes que inciden en el curso de la enfermedad.

1.2.6.2.2 Respuesta inmune Innata en la fase crónica. Pocos estudios han sido realizados con el objetivo de determinar el papel de los **leucocitos polimorfonucleares** en el desarrollo y progresión de la EC. Los hallazgos histopatológicos han mostrado escaso número de eosinófilos y neutrófilos en las lesiones cardíacas, sin embargo, estos se han asociado a daño tisular y severidad de la enfermedad. Voltarelli et al. (1990), demostraron que los neutrófilos derivados de pacientes con EC presentaron menor capacidad quimiotáctica y baja eficiencia para producir especies reactivas de oxígeno. Además, se ha descrito aumento de las metaloproteinasas de matriz extracelular 2 (MPM-2) y 9 (MPM-9) en neutrófilos y monocitos de pacientes con CCC en comparación con los no infectados. La MPM-2 promueve la inmunomodulación de la infección

(Fares et al., 2013). Actualmente, se sabe que los neutrófilos cumplen un papel clave en el control de la carga parasitaria y actúan regulando la respuesta inmune en modelos murinos infectados con *T. cruzi*. Estas células son capaces de interactuar con el parásito y realizar sus funciones efectoras tales como fagocitosis, generación de especies reactivas, de granulación y liberación de trampas extracelulares. Teniendo en cuenta, que estas funciones efectoras tienen el potencial de destruir el parásito y afectar la patogenicidad, es claro que son muy importantes durante la fase aguda, sin embargo, aún no se sabe cómo estas funciones podrían influenciar las respuestas inmunes adaptativas contra *T. cruzi* (Figura 6).

Figura 6.

Papel de los neutrófilos en la infección por Trypanosoma cruzi.



Nota: La imagen muestra como los tripomastigotes se internalizan en el neutrófilo a través de diferentes receptores, los cuales inducen la activación de vías de señalización que modulan en el neutrófilo la iniciación de procesos de fagocitosis y liberación de especies reactivas de oxígeno.

1.2.6.2.3 Respuesta inmune adaptativa en la fase crónica. Durante la fase crónica de la EC, la mayoría de los pacientes desarrollan una fuerte respuesta inmune, de tipo humoral y celular frente a diferentes antígenos derivados del parásito (Michailowsky et al., 2003). La relevancia de

esta respuesta inmune ha sido demostrada por el hecho de que los pacientes, infectados e inmunosuprimidos o en aquellos que presentan el síndrome de inmunodeficiencia adquirida (SIDA), desarrollan formas agudas muy severas de la enfermedad como resultado de la exacerbación de la carga parasitaria (Fuenmayor et al., 2005).

Estudios previos, han mostrado la importancia de las subpoblaciones de **linfocitos T CD4⁺ y CD8⁺** en el control inmune de la infección (Giraldo et al., 2013; Keesen et al., 2012). Evidencia experimental obtenida a partir de pacientes con CCC y en modelos murinos infectados ha demostrado que durante la fase crónica de la infección se activa una fuerte respuesta inmune tipo Th1 comparado con la observada en pacientes en fase IND. A nivel de sangre periférica, se han detectado altos niveles de expresión de TNF α e INF γ proveniente de las células mononucleares circulantes, aumento en el número de LT CD4⁺ y CD8⁺ productor de INF γ y un reducido número de células Treg CD4⁺CD25⁺ productoras de IL10 y de células Treg CD4⁺CD25⁺FoxP3⁺. Más aún, la expresión de IL10 a partir de monocitos de pacientes en fase IND fue más alta que la encontrada en pacientes cardiacos. Así mismo, el análisis del infiltrado inflamatorio mediante ensayos de expresión RNAm en el miocardio proveniente de pacientes con CCC encontró aumentada expresión de INF γ y TNF α , así como niveles bajos o indetectables de IL4, IL6, IL7 y IL15 demostrando claramente un perfil Th1 a nivel de tejido, lo que se correlaciona con el perfil hallado en sangre periférica. Para corroborar esto, se evaluó la expresión de factores de transcripción (FT) como GATA3, FoxP3 y ROR γ T propios de las subpoblaciones Th2, Treg y Th17 respectivamente, así como su perfil de citocinas, encontrándose la expresión de los tres FT en muy baja concentración o indetectable. Estos resultados sugieren que el infiltrado Th1 predomina en el miocardio de los pacientes con CCC y parece estar poco regulado, lo que podría explicar el daño observado en el tejido (Nogueira et al., 2014)

Quizás otro hallazgo interesante y un poco subestimado se relaciona con la acumulación selectiva de estas células (Th1) en el tejido cardiaco. Cunha-Neto y Chevillard (2014), utilizando microscopía confocal y PCR en tiempo real (qPCR) para estudiar el miocardio de pacientes con CCC, encontraron células mononucleares que expresaban receptores de quimoquinas **CXCR3**, **CCR7**, **CCR5**, **CCR4**, y algunos ligandos como **CXCL9**, **CCL9**, **CCL5** y **CCL2**. Estos hallazgos podrían sugerir la importancia de estas moléculas quimioatrayentes de la subpoblación Th1 como responsables de la acumulación de estas células en el tejido cardiaco.

No obstante, según las investigaciones realizadas por Marino et al. (2005) quienes estudiando los efectos de la modulación de la expresión de genes de matriz extracelular en el tejido cardiaco de ratones infectados con *T. cruzi*, detectaron altos niveles de quimoquinas (CC) especialmente RANTES y MIP 1 α , junto con células LTCD8⁺ que expresaban en su superficie CCR5⁺. Estos hallazgos les permitieron proponer que las quimoquinas CC y sus receptores están involucradas con la migración diferencial y patogénesis mediada por las células TCD8⁺.

En cuanto a los LTCD8⁺ y la resistencia frente a *T. cruzi*, su relevancia se ha demostrado no sólo por el mayor predominio de la subpoblación LTCD8⁺ en fragmentos de biopsia miocárdica de pacientes con CCC (Sun y Tarleton, 1993; Silverio et al., 2010), sino también por la habilidad de los LTCD8⁺, provenientes ya sea de pacientes chagásicos de tipo crónico o de ratones infectados con *T. cruzi*, para actuar como linfocitos citotóxicos frente a células infectadas con *T. cruzi* (Silverio et al., 2012). Además, por la aumentada carga de parásito en el tejido en ausencia de respuesta inflamatoria y por la rápida mortalidad de los ratones infectados en ausencia de LTCD8⁺.

Basado en la expresión combinada de los marcadores CD27⁺ y CD28⁺, Appay et al. (2002), propusieron un modelo de diferenciación para células de memoria LTCD8⁺ en la cual CD27⁺CD28⁺, CD27⁻CD28⁺ o CD27⁺CD28⁻ y CD27⁻CD28⁻ son consideradas subpoblaciones de

células de memoria en estadio de diferenciación temprano, intermedio y tardío respectivamente. Igualmente, la expresión del receptor de quimoquina CCR7, el cual facilita el *homing* hacia el nódulo linfoide, permitió la discriminación en células T de memoria central (CD45RA⁻CCR7⁺), a la cual le faltan las funciones efectoras intermedias y tienen la capacidad de migrar a los nódulos linfoides y, las células T de memoria efectora (CD45RA⁺CCR7⁻), las cuales circulan hacia el tejido periférico y exhiben función efectora rápida en presencia del antígeno. Por lo tanto, un análisis más cuidadoso de estas células en cuanto a sus propiedades funcionales y su relación con los grados de severidad de la enfermedad puede ser estimado teniendo en cuenta la presencia o ausencia de estos marcadores de superficie. Así pues, un estudio previo mostró que los sujetos sin manifestaciones cardíacas o muy leves presentaban mayor capacidad para activar respuestas tipo INF γ específicas para *T. cruzi* en comparación a los sujetos que padecían la enfermedad cardíaca más avanzada (Gomes et al., 2003). Así mismo, la población de células TCD8⁺ de memoria específicas de *T. cruzi* se observó enriquecida en células en estado de diferenciación temprano (CD27⁺CD28⁺).

En contraste, la frecuencia de LTCD8⁺CD27⁺CD28⁺ en la población de LTCD8⁺ memoria total, estuvo disminuida en tanto que la enfermedad llegaba a ser más severa, mientras que la proporción de LTCD8⁺ de memoria en estadio de diferenciación tardío (CD8⁺CD27⁻CD28⁻) aumentaba (Albareda et al., 2006). Estos resultados son consistentes con la hipótesis de un fenotipo de agotamiento gradual o también conocido como “T cell exhaustion” en la población de células T CD8⁺ de memoria.

Conviene subrayar que el fenotipo exhausto se relaciona con el hecho de que la célula T efectora gradualmente pierde su función. Esta pérdida de la función es jerárquica, es decir, inicialmente ocurre la pérdida temprana de la producción de IL2, seguido por la pérdida de la

capacidad de producir $\text{FNT}\alpha$ y finalmente, sucumbe la capacidad producción de $\text{INF}\gamma$. Las células T exhaustas presentan marcadores fenotípicos que están típicamente asociados con poblaciones de memoria efectora y a una alta expresión de receptores inhibitorios, entre estos el antígeno 4 del linfocito T citotóxico (CTLA-4/ CD152) y el receptor 1 asociado a la inmunoglobulina del leucocito (LIR-1). Por último, a pesar de la gran cantidad de datos disponibles sobre las características de la respuesta inmune en EC, aún no se conocen completamente los mecanismos involucrados en el mantenimiento de las células T de memoria y su papel en la transición desde la fase asintomática a la cardiomiopatía (Yi y Zajac, 2010).

En EC puede jugar un papel antiinflamatorio mediante la supresión de la función proinflamatoria de las células Th1 sin interferir con la eliminación del parásito (Guedes et al., 2012).

Las células Th17 han sido asociadas a la patogénesis de algunas enfermedades inflamatorias, autoinmunes e infecciosas como esquistosomiasis (Rutitzky y Stadecker, 2006), toxoplasmosis (Matsuzaki y Umemura, 2007) y tuberculosis (Weaver et al., 2007). La IL17 no sólo es producida por las células Th17 sino también por otros tipos de células como LTCD8+, neutrófilos, monocitos y las células NK. Recientemente se ha evaluado el papel de la IL17 durante la infección por *T. cruzi*. Los ratones infectados con *T. cruzi* fueron tratados con anticuerpo monoclonal IL17 lo cual resultó en mortalidad prematura, reducción del parasitismo cardiaco y aumentada producción de $\text{TNF}\alpha$ e $\text{INF}\gamma$, quimoquinas y receptores de quimoquinas e incremento del infiltrado inflamatorio cardiaco comparado con el grupo control. Por lo tanto, estos resultados sugieren que la IL17 puede ser importante en el control de la inflamación cardíaca mediante un feedback negativo sobre la producción de $\text{TNF}\alpha$, $\text{INF}\gamma$ y quimoquinas durante la infección experimental de *T. cruzi* (Cai et al., 2016).

Algunos estudios han señalado la importancia de los anticuerpos para la eliminación del parásito y la sobrevivencia del hospedero. Un estudio realizado en ratones deficientes en linfocitos B mostró una respuesta de hiper susceptibilidad a la infección por *T.cruzi* demostrando tasa de mortalidad prematura e incremento de la parasitemia. Las propiedades biológicas de los anticuerpos IgG pueden ser diversas y tienen un efecto importante sobre la historia natural de la enfermedad de Chagas. La producción de diferentes subclases de IgG está controlada por diferentes citocinas. En los pacientes chagásicos crónicos la IgG1 y la IgG2 forman el 90% de las IgG producidas. Las citocinas Th1 (IL12, IFN γ , TNF α) son responsables de la producción de IgG1 e IgG3, mientras las citocinas Th2 (IL4, IL10) estimulan la producción de IgG2. La IgG1 media la lisis mediante la unión al complemento mientras la IgG2 media la inmunidad mediante la activación de las células efectoras no fagocíticas (Michailowsky et al., 2003).

Aún no ha sido definido si existe una correlación entre las diferentes formas clínicas de la EC y los niveles de subclases de IgG junto con la severidad tanto en modelos murinos como humanos. Algunos estudios no detectaron diferencias entre los niveles de inmunoglobulinas entre individuos con diferente manifestación clínica, otros observaron altos niveles de IgG2 en el suero de pacientes con manifestaciones cardiacas o gastrointestinales (Primavera et al., 1990; Carrillo-Sánchez et al., 2016).

- **Población de linfocitos T reguladores (Treg)** las células T reguladoras (Treg) CD4⁺CD25^{high} han sido descritas como una única población de células que regulan la respuesta inmune innata y adaptativa y tienen la capacidad de controlar el efecto excesivo o desregulado de la respuesta inmune frente a los patógenos o antígenos propios (Cools et al., 2007). En las enfermedades infecciosas causadas por parásitos protozoarios, un número de publicaciones se han centrado sobre el papel de las células Treg en pacientes con EC (De Araujo et al., 2011). La

inmunofenotipificación de las células de sangre periférica posterior a la estimulación con antígenos de *T. cruzi* demostró que los individuos en fase indeterminada tienen una mayor frecuencia de Treg, sugiriendo que una expansión de esas células podría ser benéfico, dado que posiblemente limita la fuerte actividad citotóxica y por ende el daño al tejido. Análisis adicionales demostraron un estatus activado de las células Treg basado en la baja expresión de CD62L y alta expresión de CD40L, CD69+ y CD54+ por células de todos los pacientes chagasicos después de la estimulación antigénica con *T. cruzi*. Sin embargo, hubo un incremento en la frecuencia de la población foxp3+CD25highCD4+ que fue también IL10+ en la fase IND, mientras en el grupo cardiaco, hubo un incremento en el porcentaje de Foxp3+CD25highCD4+ que expresaba CTLA4+. Estos datos sugieren que la IL10 producida por las Treg es efectiva en controlar el desarrollo de la enfermedad en pacientes en fase IND. Sin embargo, en pacientes con cardiomiopatía el mismo mecanismo regulador mediado por la **expresión de IL10 y CTLA4 es improbable que sea suficiente** para controlar la progresión de la enfermedad. Estos datos sugieren que las células Treg pueden jugar un importante papel en el control de la respuesta inmune en la ECh y el balance entre las células T efectoras y reguladoras constituye un factor importante para la progresión y desarrollo de la enfermedad (Sathel-Avelar et al., 2009).

1.2.7 Alteración de la matriz extracelular y remodelamiento

Los tejidos están constituidos por varios tipos de células tales como fibroblastos, células epiteliales, endoteliales, y células del sistema inmune, así como redes no celulares; todas embebidas en una matriz extracelular (ME) (Silva et al., 2021). La ME opera no sólo como una barrera estructural física para las células, sino también como un medio de comunicación, dado que,

orquesta funciones celulares cruciales a través de interacciones célula-célula e interacciones matriz-célula (Karamanos y Theocharis 2019). Específicamente, los elementos de la ME pueden influenciar la proliferación, migración, sobrevivencia, diferenciación, así como homeostasis del tejido, morfogénesis, angiogénesis, función inmune y autofagia (Lavandero et al., 2015). Las **macromoléculas** constitutivas de la ME son proteínas fibrilares que incluyen colágenos, fibronectina, lamininas, elastinas, proteoglicanos (PG), glucosaminoglicanos (GAG) y algunas glicoproteínas incluyendo proteínas matricelares, las cuales juntas crean redes tridimensionales complejas, pero bien organizadas. Adicionalmente, coexisten en este microambiente factores de crecimiento, citocinas y enzimas modeladoras de la matriz (Li et al., 2018). Los componentes de la matriz extracelular son sintetizados y secretados por todas las células para atribuir adaptabilidad y soporte celular, mientras las macromoléculas pueden secuestrar mediadores de la matriz extracelular creando una fuente de moléculas de señalización tales como factores de crecimiento y citocinas, en ese sentido, la composición de la matriz extracelular difiere entre los tejidos, fases de desarrollo y condiciones patofisiológicas. (Bloksgaard et al., 2018).

Las principales moléculas identificadas en la **membrana basal** son: colágeno IV, laminina, nidogeno, heparán sulfato, proteoglicanos (PG), perlecan y agrin. En las matrices intersticiales predominan los colágenos fibrilares, proteoglicanos, fibronectina y proteínas matricelulares (Da costa et al., 2019).

Los **PG** son actores principales de la ME, dado que ellos orquestan numerosas funciones. Diferentes números y tipos de glucosaminoglicanos (GAG) están covalentemente unidos a la estructura principal del proteoglicano. Los GAG son cadenas lineales heterogéneas de disacáridos repetitivos y con que están constituidos mayormente por una hexosamina (N-acetil D-

galactosamina o N-acetil D glucosamina) y un ácido hexurónico (D-glucurónico o ácido lidurónico) o por galactosa.

Los **GAG están agrupados en seis categorías:** condroitin sulfato, dermatan sulfato, heparán sulfato, heparina, keratan sulfato y hialuronano. Excepto hialuronano, todos los otros GAG puede ser sulfatados en varias posiciones de ácido urónico, hexosamina o galactosa proveyendo disacáridos y PG con remarcable diversidad estructural y funcional.

De acuerdo, a la última nomenclatura, los PG son categorizados basados en su localización celular y subcelular, en la homología de gen y proteína, y en la existencia de motifs proteicos particulares dentro de su estructura principal. Así, los PG son clasificados como intracelulares, de superficie celular, pericelulares y extracelulares.

- **PG de superficie celular** dependiendo de la manera en que estén unidos a la membrana celular están divididos en transmembrana incluyendo: sindecanos, betaglicanos y fosfocian y anclas de glicosilfosfatidilinositol (GPI) representados por glicoproteínas.

- **PG pericelulares:** Respecto a los PG pericelulares, perlecan, agrin, and colágeno XVIII y XV están incluidos.

- **PG extracelulares:** contiene la subfamilia de hialectano/lecticanos con los principales representativos agrecan y versican, la subfamilia de proteoglicanos ricos en leucina como: decorina, biglicano y lumican.

La gran familia de proteínas del colágeno comprende 28 tipos y consisten en estructuras complejas y abundantes en mamíferos y en particular, representan un tercio de las proteínas totales en los humanos. Dependiendo del dominio de homología y función, los colágenos están divididos en 7 grupos: colágeno fibrilar, colágeno que forma redes y colágeno que forma filamentos, fibras de anclaje, colágenos asociados a fibrillas.

Fibronectina, es una glicoproteína que es expresada de forma ubicuota en la matriz extracelular y puede ser encontrada ya sea como dímero o como fibrilla, posee un papel importante en el ensamble de la matriz. Otra importante proteína de la matriz extracelular son las lamininas y proteínas matricelulares las cuales están involucradas en funciones cruciales para la homeostasis del tejido y reparación de herida.

1.2.7.1 Interacción matriz extracelular – cardiomiocitos. Las células coordinan múltiples funciones a través de diferentes receptores extracelulares, tales como: integrinas, receptores con dominio discoidina (DDR_s), PG de superficie y CD44.

Las integrinas son receptores responsables de la adhesión celular debido a su habilidad para entrecruzar el citoesqueleto de actina con los componentes de la matriz extracelular, además de facilitar las cascadas de señalización, principalmente a través de tirosina quinasas Src. Las integrinas están conformadas por dos subunidades heterodiméricas α y β siendo la subunidad β la responsable de activar las vías de señalización a través de la unión de activadores intracelulares. Este mecanismo regula la afinidad de las integrinas con elementos de matriz extracelular y, por ende, la migración y adhesión celular. Las integrinas son expresadas por células del estroma y por las tumorales y son importantes para su comunicación con el microambiente tumoral.

Los fibroblastos asociados a cáncer son responsables de la mayoría de las alteraciones de la ME en el microambiente tumoral.

- **DDR_s** pertenecen a la familia de tirosina-quinasa, regulan funciones celulares cruciales, tales como proliferación, diferenciación y migración en condiciones fisiológicas y su desregulación contribuye a enfermedades como fibrosis y cáncer (Leitinger, 2014).

- **CD44** puede actuar como receptor de PG y regulador de la transducción de señal. Debido a su dominio de Ig, CD44 opera como receptor para factores de crecimiento, citocinas, metaloproteinasas (MMP) y HA (Suleiman et al., 2018). Heparán sulfato o condroitin sulfato unido a CD44 une a factor de crecimiento vascular y factor crecimiento del hepatocito, mientras su dominio citoplasmático es responsable por la unión de proteínas reguladoras intracelulares.

1.2.8 Desregulación del metabolismo de la quinurenina

La vía de la quinurenina (VQN) representa una ruta importante del metabolismo del triptófano en mamíferos. Los metabolitos de la VQN relacionan aspectos importantes de la patofisiología de la FC, tales como inflamación, homeostasis de la energía, apoptosis y estrés oxidativo (Lund et al., 2020).

Altos niveles en plasma de quinurenina (QN), 3 hidroxiquinurenina (3HQN), ácido quinolinico (AQ) y la proporción quinurenina/triptofano (Q/TR) han sido asociados con mortalidad en pacientes con falla cardiaca (Lund et al 2020). Por otra parte, investigaciones recientes han implicado a algunos productos derivados del metabolismo del triptofano en la patología de la fibrosis (Dolivo et al., 2018). Adicionalmente, hay reportes que evidencian que la quinurenina y otros metabolitos de la VQN inducen la apoptosis en macrófagos, células T y B y células NK (Fallarino et al., 2006).

1.3 Cardiomiopatía no chagásica

Las cardiomiopatías no chagásicas comprende un grupo de enfermedades del músculo cardíaco, que incluyen cardiomiopatía hipertrófica, restrictiva, arritmogénica ventricular derecha, y dilatada (CMD).

1.3.1 Cardiomiopatía dilatada idiopática (CMD)

La **CMD** es una enfermedad caracterizada por dilatación y alteración de la contractilidad del ventrículo izquierdo o ambos y se acompaña de desarrollo progresivo de falla cardíaca congestiva y ocurrencia de arritmias severas (Bozkurt et al., 2016). La disminución en la función contráctil es la característica hemodinámica de la CMD, una anomalía que desencadena respuestas neurohumorales complejas, las cuales aumentan el volumen circulatorio para mantener el gasto cardíaco. Aunque estos mecanismos inicialmente tratan de compensar la caída del gasto cardíaco, al final estas respuestas llegan a ser perjudiciales; contribuyendo al deterioro clínico y al comienzo de la falla cardíaca.

Una gran variedad de factores (tóxicos, infecciosos, metabólicos, inmunológicos etc.) han sido etiológicamente implicados en la CMD. Cabe señalar, que la CMD es a menudo caracterizada como *idiopática*, cuando no se reconoce a ninguno de los factores antes mencionados como causa de la enfermedad. La prevalencia reportada de la CMD en Europa y Norte América es de 36 casos por 100.000 y la incidencia anual varía entre 5 a 7.9 casos por 100.000 habitantes. La prevalencia de CMD es aparentemente baja en Asia y podría ser más alta en África y Latinoamérica comparado con Europa. La variedad de causas, mecanismos patofisiológicos subyacentes y diferentes

expresiones fenotípicas influyen tanto en su presentación y respuesta al tratamiento. Aunque los pacientes con las distintas cardiomiopatías comparten algunos síntomas clínicos también se ha observado características específicas en la clínica y en sus respuestas terapéuticas. A la fecha aún no se conocen las causas de estas diferencias.

1.4 Herramientas ómicas

El término “ómicas” se refiere al análisis conjunto de un gran número de moléculas (ADN, RNA, proteínas y metabolitos) obtenidas a partir de muestras biológicas. Este término involucra el estudio de diversas disciplinas como la genómica, transcriptómica, proteómica, y metabolómica.

Estas ciencias surgen gracias al secuenciamiento del genoma humano y al subsiguiente desarrollo de tecnologías analíticas de alto rendimiento para la separación, identificación y cuantificación de moléculas, una de ellas, la cromatografía líquida de alta resolución acoplada a espectrometría de masas (LC-MS), la cual ha permitido identificar y cuantificar proteínas y/o metabolitos a partir de muestras biológicas complejas (Evans, 2000; Guo y Lankmayr, 2010). Así mismo, estos avances han ido de la mano con el desarrollo de computadoras con gran capacidad de procesamiento y análisis de grandes cantidades de datos (Boja et al., 2014). En este capítulo exploraremos los conceptos de la proteómica y metabolómica.

1.4.1 Proteómica

La proteómica se entiende como el análisis detallado de todas las proteínas expresadas en un momento dado frente a una condición fisiológica o patológica. Así mismo, esta aproximación

facilita un mayor entendimiento de los procesos biológicos mediante el análisis comparativo de los cambios en los niveles de expresión y /o a través de las interacciones proteína-proteína. Este enfoque se basa en el análisis de las proteínas ya sea de forma individual o conjunta, siendo una de las primeras estrategias utilizadas para su estudio las técnicas de electroforesis mono-dimensional (1-DE) o bidimensional (2-DE) en geles de poliacrilamida. Durante los últimos años se han logrado grandes avances en las tecnologías instrumentales que se aplican en proteómica, siendo la separación cromatográfica y la espectrometría de masas las herramientas más importantes en la actualidad empleadas en los estudios proteómicos (Li et al., 2017)

1.4.1.1 Proteómica basada en Espectrometría de masas

1.4.1.1.1 Cromatografía líquida (LC). La cromatografía es una técnica analítica donde los componentes de una muestra se separan en función de la afinidad que estos presentan en sistemas de dos fases. La plataforma utilizada en esta tesis doctoral es la cromatografía líquida de alta resolución (HPLC) del inglés, *high performance liquid chromatography*. HPLC se caracteriza por una presión de operación elevada necesaria para conseguir una velocidad óptima de la fase móvil. La fase móvil usualmente es un solvente polar y la fase estacionaria no polar, a su vez, la polaridad de la fase móvil y estacionaria puede ser optimizada para incrementar la resolución de los componentes de una mezcla. El tiempo de retención mide el tiempo que cada compuesto necesita para eluir a través de la columna, el cual es un parámetro que se tiene en cuenta para la identificación posterior de los analitos. La cromatografía de fase reversa, consiste en una fase estacionaria apolar y una fase móvil polar, de modo que las moléculas de naturaleza polar eluyen primero en comparación con la de carácter apolar, las cuales son retenidas en la columna durante

más tiempo. De este modo, la separación cromatográfica proporciona información eficiente sobre la polaridad de las moléculas detectadas. Posteriormente, las moléculas se ionizan y se introducen en el espectrómetro de masas.

1.4.1.1.2. Espectrometría de masas (MS). El análisis proteómico en esta Tesis Doctoral empleó un espectrómetro de masas Q-Exactive (ThermoScientific) dotado de una fuente de ionización nano (Proxeon) conectada en línea a un nano-HPLC Easy-LC 1000 (Figura 7). Este sistema consta de dos analizadores de masas, una trampa iónica (C trap) y una celda de colisión de alta energía (HCD). El primer analizador es un cuadrupolo (Q), el cual se encarga de seleccionar iones precursores, y el segundo un analizador tipo Orbitrap para la resolución y precisión de masas (Figura 5). Este último utiliza dos electrodos, uno tubular externo y un filamento interno coaxial, para atrapar iones en el campo electrostático formado entre ellos. En el orbitrap, los iones son introducidos de forma perpendicular y adquieren un movimiento radial cuya frecuencia es una función de su valor m/z . Este movimiento podría visualizarse como si estuviéramos bobinando un hilo en un huso convencional. Luego, la señal de cada uno de los iones es detectada y la ecuación matemática transformada de Fourier permite determinar la frecuencia derivada de cada uno de los iones y obtener el espectro de masas.

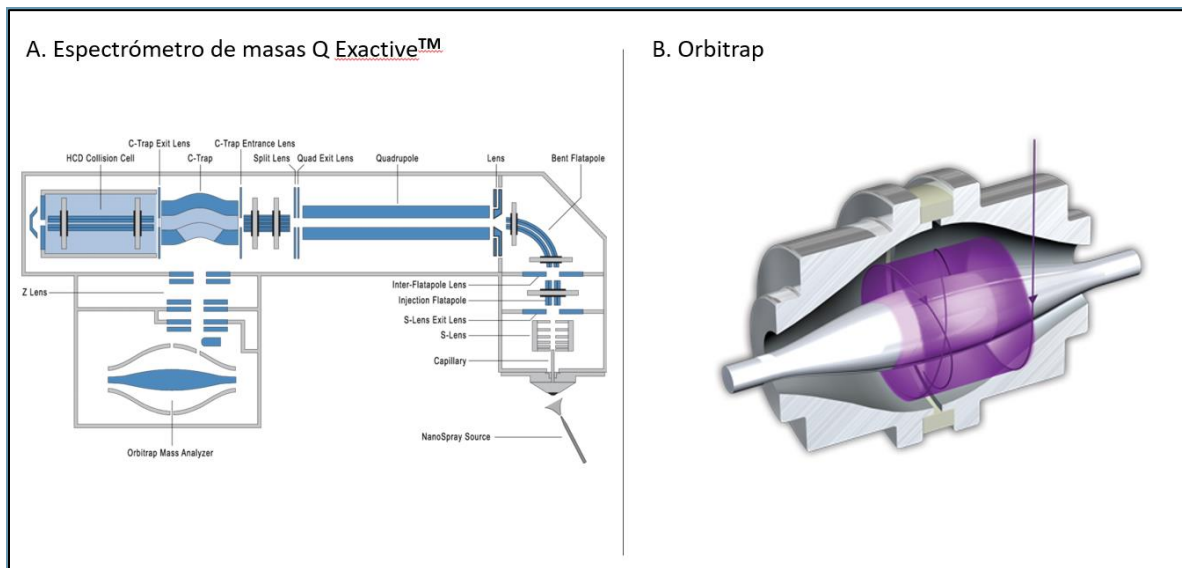
Actualmente, la identificación de proteínas se produce a través de la fragmentación de sus péptidos en una cámara de colisión CID (Del inglés, collision- induced dissociation). En CID, los péptidos ionizados se aceleran mediante un potencial eléctrico hacia niveles de alta energía cinética y colisionan con las moléculas neutras de un gas (Helio, Nitrógeno o Argón). El método CID produce la fragmentación del enlace peptídico, generando espectros MS/MS o MS², que permiten identificar la secuencia peptídica a partir de la relación m/z de los diferentes fragmentos. Esta

identificación se realiza normalmente de manera automática comparando los espectros teóricos generados en las bases de datos mediante motores de búsqueda como MASCOT o SEQUEST. Además, el Q Exactive incorpora una cámara de colisión adicional la HCD (del inglés, *high collision dissociation*) que permite la obtención de fragmentos en la región baja del espectro (Kaufmann y Bromirski, 2018).

El HCD se puede definir como un CID de alta energía, en esta cámara los iones precursores tienen una energía cinética más alta y su activación es muy rápida. Se suele usar He como gas de colisión y los espectros de fragmentación generados suelen contener, además de los iones de las series convencionales, iones producidos por fragmentaciones múltiples. Este tipo de fragmentación nos va a permitir identificar los reporteros liberados en la fragmentación de los péptidos que se encuentran en la región de bajo m/z del espectro y se utilizan para la cuantificación de experimentos de proteómica como el marcaje con etiquetas de masa en tándem (TMT, por sus siglas en inglés *tándem mass tag*) (Diedrich et al., 2013).

Figura 7.

Esquema de la estructura del espectrómetro de masas y analizador tipo Orbitrap.



Nota. Adaptado de *Thermo Fisher Scientific Exactive benchtop LC-MS orbitrap Mass Spectrometer* (<https://www.thermofisher.com/co/en/home/industrial/mass-spectrometry/mass-spectrometry-learning-center/mass-spectrometry-technology-overview/mass-analyzer-technology-overview.html>).

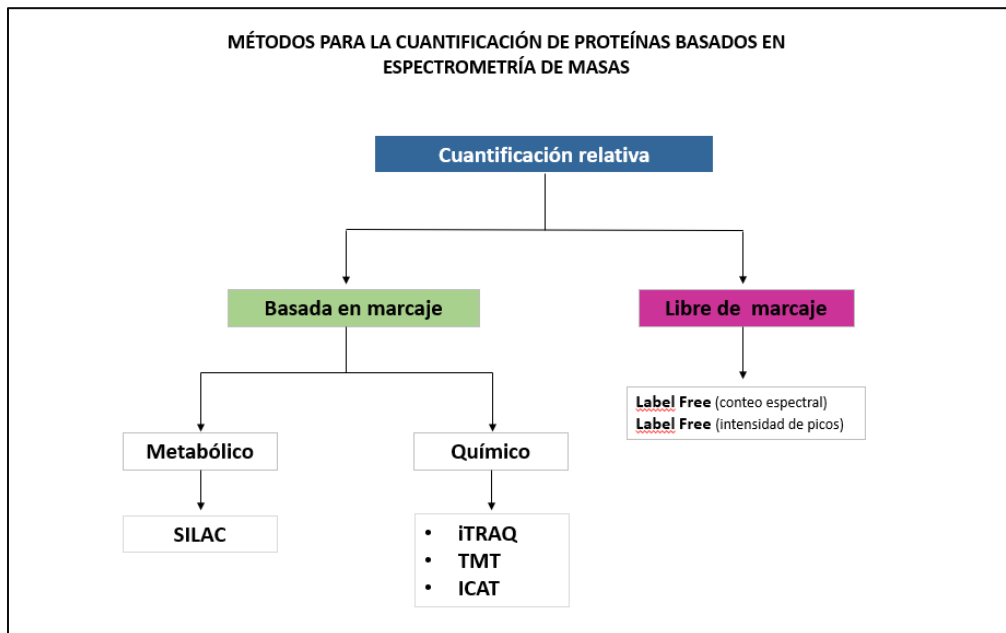
1.4.1.2 Proteómica Cuantitativa (PC). En las últimas décadas, han surgido nuevas tecnologías para el fraccionamiento de muestras complejas, las cuales, al ser combinadas con tecnologías de marcaje de péptidos con codificación isotópica y herramientas bioinformáticas, han aportado una nueva dimensión al análisis proteómico, permitiendo comparar proteomas complejos. Así, más que proveer una lista de proteínas identificadas en una muestra, la PC encuentra las diferencias en la expresión de las proteínas o péptidos entre dos o más estados fisiológicos de una célula, tejido u organismo. De otra parte, esta herramienta ha sido fundamental para el mayor entendimiento de la expresión proteica y como su abundancia puede fluctuar e incidir sobre los sistemas biológicos.

Los métodos para la cuantificación se pueden clasificar en dos: cuantificación relativa y/o absoluta, con o sin marcaje (Roanova, S et al., 2021). Las estrategias de marcaje involucran el uso de pares de isótopos ligeros y pesados o con etiquetas químicas isotópicamente diferentes. Por el contrario, otras aproximaciones prescinden del marcaje y son denominadas libres de marcaje (*Label Free*), aquí la cuantificación depende del análisis en softwares bioinformáticos (Matzke, et al., 2013). Por otra parte, las técnicas de cuantificación absoluta emplean un estándar interno que ha sido sintetizado para el monitoreo de la proteína de interés en análisis selectivos o múltiples (Calderón-Celis et al., 2018). En este trabajo se utilizó la cuantificación relativa basada en marcaje químico.

1.4.1.3 Métodos de cuantificación relativa con marcaje. Estas técnicas miden la concentración relativa del analito en relación con dos o más muestras y son utilizados para la comparación de abundancias de proteínas o péptidos (Figura 8). Los marcajes pueden ser metabólicos, enzimáticos o químicos y algunos de estos métodos son SILAC, ICAT, iTRAQ y TMT. La figura 8 muestra un esquema jerárquico de los diferentes métodos de cuantificación relativa.

Figura 8.

Métodos para la cuantificación relativa de proteínas.



1.4.1.3.1 Marcaje metabólico mediante isótopos estables (SILAC). El marcaje tipo SILAC (del inglés, Stable Isotope Labeling by Amino acids in Cell Culture) se fundamenta en la incorporación metabólica in vivo de aminoácidos “pesados” y “ligeros” etiquetados ^{13}C y /o ^{15}N en las proteínas, con el fin de alcanzar el marcado isotópico diferencial de células. Estos aminoácidos serán incorporados dentro de las proteínas sintetizadas de novo durante la fase de crecimiento celular y son proporcionados en el medio de cultivo o en el alimento (Chen X, et al., 2015).

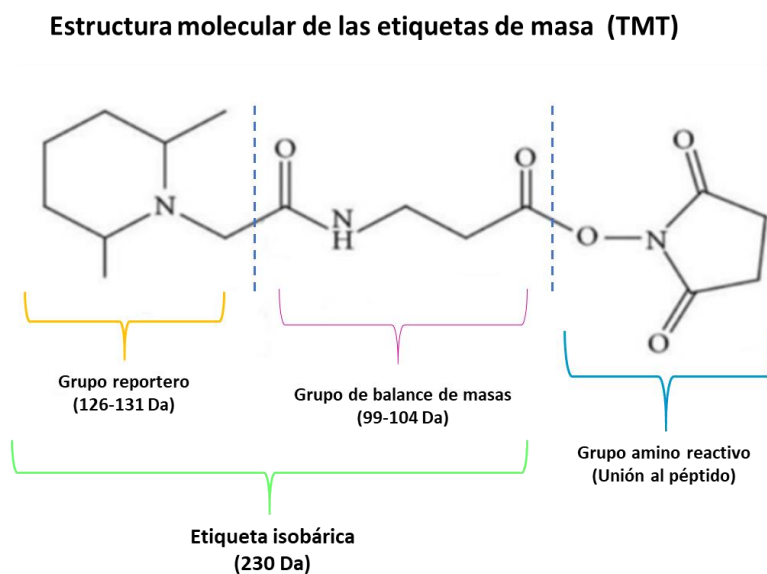
Otra modalidad para cuantificación relativa es el marcaje isobárico y a diferencia del marcaje metabólico, el marcaje isobárico ocurre subsiguiente al proceso de digestión de proteínas. Dentro de este tipo de marcaje las dos tecnologías más usadas son iTRAQ y TMT.

1.4.1.3.2 Marcaje químico isobárico con etiquetas de masa en tándem (TMT).

Actualmente, las etiquetas químicas isobáricas son una herramienta poderosa que permite la identificación y cuantificación simultánea de proteínas en diversas muestras mediante etiquetas isobáricas (Etiquetas de masas en tándem (Del inglés Tándem Mass Tags). Las etiquetas corresponden a moléculas químicas (tags) constituidas por un grupo reportero, una región espaciadora o de balance y un grupo amino reactivo (Figura 9).

Figura 9.

Estructura molecular de las etiquetas de masas para marcaje isobárico (TMT).



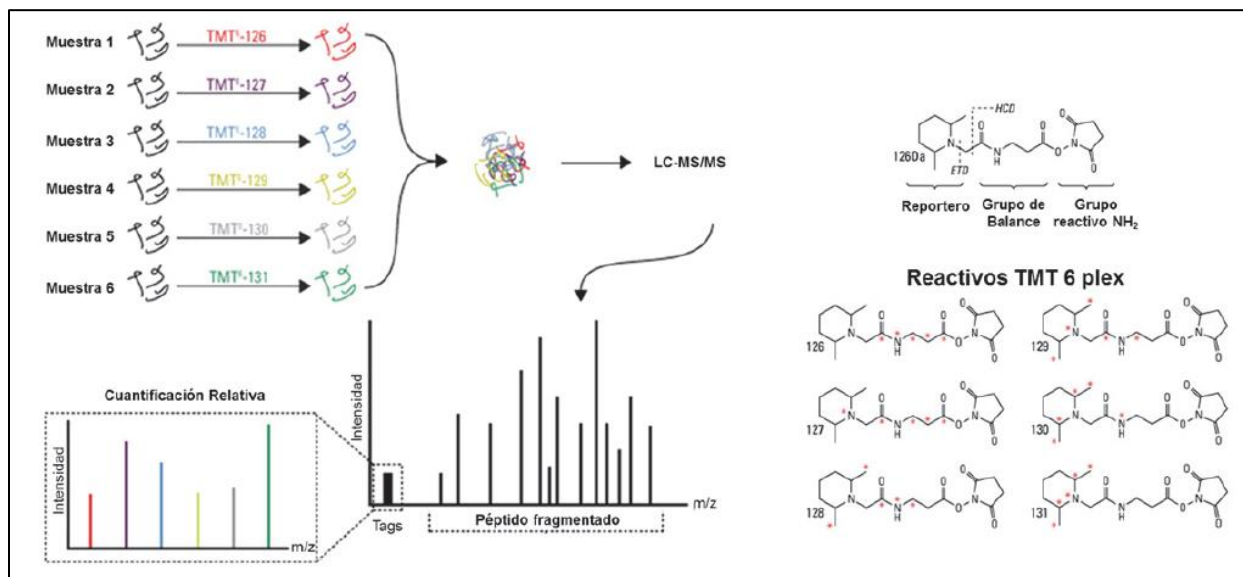
El grupo amino reactivo se une a la region amino terminal de un péptido o a un residuo de lisina. En un experimento de cuantificación relativa, diferentes etiquetas isobáricas son usadas para marcar diferentes condiciones sistémicas. Una vez marcadas todas las muestras son mezcladas y analizadas en un único experimento de LC-MS. Debido a que los tags isobáricos comparten las mismas propiedades químicas, todos los péptidos de diferentes muestras marcadas con TMT

coeluyen durante la separación por LC. Durante la fragmentación, el enlace entre el grupo reportero y el grupo normalizador de masas se rompe fácilmente y libera los iones reporteros mono cargados de distinta masa (TMT: m/z 126 a 131) para cada una de las muestras. La intensidad de dichos iones reporteros permite la cuantificación relativa de las distintas especies marcadas. Se han desarrollado kits de TMT que pueden etiquetar simultáneamente 6, 10 o 16 muestras, por tanto, permite medir la abundancia de péptidos en múltiples muestras y condiciones con réplicas biológicas al mismo tiempo.

Durante el análisis de MS/MS, cada etiqueta isobárica produce una huella de ion marcador única que hace posible la cuantificación. En un análisis de MS típico, los péptidos etiquetados se distinguen entre sí. Sin embargo, en el modo MS tándem durante el cual los péptidos se aíslan y fragmentan, cada etiqueta genera un ion marcador único. La cuantificación de proteínas se logra comparando las intensidades de los seis iones marcadores en los espectros de MS/MS (Figura 10).

Figura 10.

Esquema de marcaje químico mediante TMT-6plex (Adaptado de Thermo Scientific).



Nota. El marcaje isobárico de las muestras proteicas se inicia a partir del digerido tríptico. A cada muestra se asigna una etiqueta y se incuba por 1 hora. Una vez realizado el marcaje con las seis etiquetas (tags) del TMT, se mezclan las muestras y se realiza su análisis mediante espectrometría de masas (LC-MS/MS). Cuando se produce la fragmentación del péptido para la identificación de su secuencia, se liberan los tags de ese péptido para cada muestra, que tienen una m/z diferente permitiendo la cuantificación relativa de cada una de las muestras con respecto a las otras. Adaptado de *Thermo Scientific*, (<https://idearesourceproteomics.org/wp-content/uploads/2017/03/Tandem-Mass-Tag-TMT-Labeling-Workflow.pdf>).

1.4.2 Metabolómica

Los metabolitos son los productos finales de todos los procesos que se producen en las células, y cumplen funciones en la biología debido a su participación en diversos procesos energéticos, fisiológicos y de señalización. Mas aún, la colección total de metabolitos en una célula, tejido u organismos revela cambios en metabolitos específicos y también provee una lectura

de diferencias en las vías metabólicas subyacentes lo cual puede ser usado para entender mecanismos biológicos (Idle y González, 2007). Así mismo, las cantidades de metabolitos en condiciones de enfermedad reflejan la adaptación de los sistemas biológicos a los estados patológicos. Hoy se estima que hay más de 2.000 metabolitos diferentes que pueden ser sintetizados de forma endógena y otros tantos provienen de la dieta. Otro factor contribuyente importante para el conjunto de metabolitos del organismo es la flora intestinal. Al igual que en el caso de la proteómica, el objetivo de la metabolómica es caracterizar el complemento de moléculas pequeñas de una muestra determinada e interrogar a las redes metabólicas en condiciones normales y patológicas, de manera cualitativa y cuantitativa. Debido a la amplia variedad de metabolitos presentes en las muestras biológicas, actualmente, no es posible detectar todas las clases de compuestos con un único método analítico. Por este motivo para la adquisición de datos en estudios metabolómicos no dirigidos la mejor estrategia es la cromatografía líquida de alta resolución acoplada a espectrometría de masas (Want, 2018).

1.4.2.1 Metabolómica basada en espectrometría de masas. La metabolómica basada en MS constituye una estrategia sensible para recopilar información de un perfil metabólico, dado que genera conjuntos de datos complejos y a gran escala, siendo el análisis de estos datos crucial para extraer información biológicamente relevante. Muchos estudios de metabolómica presentan un número moderado de muestras, conjuntos de datos de dimensiones extremadamente altas y diseños experimentales complejos que requieren un uso cuidadoso de la estadística avanzada.

Actualmente, dos técnicas dominan los estudios metabolómicos la resonancia magnética nuclear (RMN) y la MS (Raamsdonk et al, 2001). Durante un experimento metabolómico por MS las muestras biológicas primero son sometidas a sistemas de separación líquida o gaseosa. Luego,

las moléculas deben ser ionizadas para ser detectadas mediante MS y finalmente, los metabolitos se identifican en base a su relación masa/carga (Lynn, 2015). Por otra parte, se considera que la metabolómica informa sobre el fenotipo del organismo. Así, las alteraciones del metaboloma pueden utilizarse como biomarcadores para el diagnóstico, el pronóstico o el seguimiento de la evolución de una amplia gama de enfermedades, como el cáncer, las enfermedades neurodegenerativas, las enfermedades raras y cardiovasculares (Botas et al., 2015; Wishart et al., 2019; Kumar y Misra, 2019). Actualmente, las enfermedades cardiovasculares son consideradas enfermedades complejas, en este sentido, algunos estudios metabolómicos han sido realizados en modelos de isquemia miocárdica, insuficiencia cardíaca y aterosclerosis (Deidda et al., 2015).

1.4.2.1.1. Cromatografía de Interacción Hidrofílica (HILIC). Uno de los tipos de cromatografía utilizados para estudios metabólicos es la cromatografía de interacción hidrofílica (HILIC), se emplea en muestras donde predominan analitos muy polares como algunos aminoácidos, hidratos de carbono y ciertos lípidos (Alpert AJ, 1990). La HILIC se puede considerar una extensión de la cromatografía en fase normal en el ámbito de las fases móviles acuosas. Las fases móviles son mezclas de agua o solución tampón (< 40%) con eluyentes orgánicos. Las fases estacionarias son adsorbentes polares muy hidrofílicos como la sílice, rellenos poliméricos polares e intercambiadores iónicos. El factor común de todas estas fases estacionarias es que pueden adsorber fácilmente agua, de ahí su clasificación como “hidrofílicas”. Los métodos de gradiente empleados en el modo HILIC son exactamente los opuestos a los que se utilizan en el modo de fase reversa. Las condiciones iniciales comprenden una elevada proporción de eluyente orgánico, normalmente el 95%, y hay un cambio progresivo a una mayor proporción de eluyente acuoso. Estudios comparativos han demostrado que los adsorbentes tipo HILIC tienen mayor

selectividad y especificidad altamente ortogonal que mejoran la cobertura de los principales grupos de metabolitos en comparación con la fase reversa (Wernisch y Pennathur, 2016). Sin embargo, es esencial el conocimiento de las propiedades de los analitos para evitar el sesgo cromatográfico y la exclusión de analitos en los estudios de metabolómica.

1.5 Estudios proteómicos y metabolómicos que se han adelantado en Cardiomiopatía Chagásica Crónica

CCC representa un problema de salud pública en Latinoamérica y se caracteriza por su mayor severidad frente a otras cardiomiopatías destacándose su naturaleza multifactorial y compleja. Diferentes enfoques se han implementado para dilucidar los mecanismos subyacentes al desarrollo de la patología, entre estos: estudios genéticos, moleculares, celulares, clínicos en humanos, en modelos animales y células madre (Acosta Herrera et al., 2016). En la última década, los estudios ómicos han representado una alternativa de alto rendimiento para abordar el problema, dado que este tipo de herramientas metodológicas ofrecen gran capacidad para resolver simultáneamente miles de proteínas en un solo procedimiento y para detectar modificaciones post y co-traduccionales imposibles de predecir a partir de la secuencia genómica.

En la literatura, al momento de redactar este manuscrito, se han reportado 3 estudios proteómicos en muestras de miocardio con CCC. El primer reporte corresponde al estudio realizado por Texeira et al, (2006) en Brasil, los cuales utilizando electroforesis bidimensional (E-2D) y MALDI-TOF en muestras de pacientes con falla cardiaca secundaria a EC, detectaron 112 proteínas, las cuales se relacionaron a metabolismo, actividad contráctil, apoptosis, respuesta inmune y estrés. Mas tarde, Garg et al, (2016) caracterizaron la huella proteómica en el suero,

mediante el análisis proteómico las células mononucleares de sangre periférica de pacientes con CCC frente a pacientes con CMD. Esta aproximación, permitió detectar proteínas involucradas en la desorganización del citoesqueleto y en el reclutamiento de células inmunes. Mas reciente, Teixeira et al, 2021 reporta alteraciones en la expresión de proteínas asociadas con el metabolismo energético mitocondrial utilizando electroforesis en gel diferencial (E2D-DIGE) en muestras de tejido miocárdico con CCC, isquémico y CMD, en comparación con muestras de tejido miocárdico de donantes sanos (Teixeira et al, 2021).

Otra aproximación empleada en el estudio de la CCC ha sido la dirigida a encontrar nuevos blancos terapéuticos utilizando proteómica. En este sentido, Wozniak et al. (2020), analizaron el proteoma y el fosfo-proteoma en el tejido de un modelo murino de la EC. Los resultados demuestran aumento en las proteínas de respuesta inmune y disminución en algunas proteínas mitocondriales. El análisis del fosfoproteoma encontró alteraciones en las proteínas del citoesqueleto y de la membrana plasmática.

En cuanto a estudios metabolómicos en CCC se han informado dos estudios en modelos murinos de infección crónica con *T. cruzi*. El análisis metabolómico de la EC crónica se ha limitado a muestras de suero y del tracto gastrointestinal (Hossain et al, 2020). El análisis del suero demostró cambios significativos en el metabolismo de los aminoácidos y los lípidos, en particular las acilcarnitinas, los esfingolípidos y los glicerofosfolípidos (Lizardo et al, 2019). El análisis de muestras del tracto gastrointestinal observó perturbaciones metabólicas persistentes en el esófago y el intestino grueso en la EC crónica, incluida la elevación de acilcarnitinas, fosfatidilcolinas y derivados de aminoácidos inducida por la infección. Sin embargo, los cambios metabólicos en el corazón pueden diferir de los que se producen en la circulación o en el tracto gastrointestinal (Girones et al, 2014). A pesar de los avances obtenidos en las investigaciones anteriormente

mencionadas y de los grandes éxitos clínicos y de salud pública en los últimos 20 años en la prevención y el control de la enfermedad de Chagas, aún persisten muchos retos importantes. Por lo tanto, es esencial realizar un análisis proteómico y metabolómico integrado a partir de tejidos de pacientes con la EC crónica.

1.6 Integración de datos ómicos

El entendimiento de los procesos biológicos complejos en los seres vivos constituye una cuestión relevante y ha sido una pregunta permanente para muchos investigadores. Los aspectos necesarios para entender los fenómenos complejos de cualquier enfermedad no pueden ser captados por un único tipo de dato, porque los diferentes componentes de un sistema biológico no actúan individualmente, sino más bien, a través de interacciones dinámicas, coordinadas y no lineales de un gran número de componentes que favorecen el funcionamiento del sistema en sí mismo. En ese sentido, una función biológica surge como una propiedad del sistema y no es encontrada en sus componentes individuales sino únicamente en el contexto de una red biológica.

Actualmente, la disminución en los costos de secuenciación y el desarrollo de tecnologías de alto rendimiento ha permitido la disponibilidad de grandes cantidades de datos en múltiples dimensiones. Estas dimensiones incluyen: secuencias de ADN, estado epigenético, genómica de célula única, proteómica, mediciones fenotípicas y funcionales. Idealmente, podemos combinar o integrar diferentes tipos de datos para crear una visión holística de la célula, salud humana o la enfermedad (Hasin et al., 2017). La integración de datos hace referencia entonces, al proceso por el cual diferentes tipos de datos biomédicos en su más amplio sentido son combinados como variables predictoras para permitir un modelamiento más comprensivo de los resultados más

relevantes (Subramanian et al., 2020). La combinación de múltiples tipos de datos puede compensar la pérdida de datos o la información no confiable de un único tipo de dato. De esta forma, disminuir la probabilidad de errores debido a falsos positivos.

Estos avances tecnológicos han direccionado el desarrollo de la bioinformática, ya que, para el procesamiento de tal cantidad de datos se requiere la disponibilidad de nuevas herramientas de análisis. Así, la aplicación de la bioinformática facilita el entendimiento de la biología de sistemas, la cual se enfoca en organizar, integrar y racionalizar los diferentes datos ómicos a través del análisis estadístico, el modelado asistido por computador y la visualización (Pavlopoulos et al., 2015). Requiere diferentes competencias científicas para darles estructura, mejorar nuestra comprensión de las propiedades emergentes y ganar capacidad para predecir el comportamiento de un sistema y explotarlo con fines aplicativos. Por otra parte, las tecnologías de alto rendimiento permiten recopilar información molecular integral a escala genómica -colectivamente denominada -omics-, las cuales incluyen transcriptómica, proteómica (incluye el estudio del nivel de proteínas y datos de modificaciones postraduccionales a gran escala), metabolómica e interactómica. Cada una de estas tecnologías trata con una diferente capa de funcionamiento tisular o celular y han sido desarrolladas para descifrar la complejidad celular e investigar los sistemas biológicos. Además, cabe señalar que el entendimiento actual de las funciones biológicas no está limitado por la disponibilidad de datos sino más bien, por nuestra capacidad para procesarlos e integrarlos. La integración de dos o más tipos de datos ómicos conectaría estos estratos del funcionamiento celular. Este enfoque allana el camino para la identificación de propiedades emergentes funcionales y sus principios de diseño tanto a nivel celular como a nivel organismal. De otro lado, algunas enfermedades son de naturaleza multifactorial y se ven afectadas por la alteración de una gran cantidad de productos genéticos cuya interacción puede modificar profundamente la

penetración de la enfermedad y la eficacia de un enfoque terapéutico dado. Por último, La medicina de precisión se enfoca en determinar la predisposición, los biomarcadores diagnósticos, pronósticos y predictivos y las rutas biológicas implicadas para así brindar atención óptima y personalizada a las diversas enfermedades tanto crónicas como agudas (Ahmed, 2020)

Las enfermedades cardiovasculares son multifactoriales y el fenotipo deriva de la interacción de factores genéticos y ambientales. Cada vez los datos ómicos han llegado a ser más precisos y de menor costo, ellos podrían ser usados para guiar la elección, diseño y el seguimiento de enfoques terapéuticos efectivos, por ejemplo, las nuevas terapias efectivas contra el cáncer las cuales están dirigidas a la señalización específica (Friedman, AA, 2015). La mayoría de los esfuerzos actuales para adaptar a los pacientes a las terapias dependen de tecnologías moleculares, a menudo genómicas, basadas en la idea de que los cánceres son como trastornos genéticos raros, a pesar de la presencia de cambios epigenéticos generalizados, impulsores específicos del linaje y vulnerabilidades no impulsadas por oncogenes

La medicina basada en datos ómicos tiene como objetivo transformar las estrategias diagnósticas y terapéuticas, siendo en el futuro próximo, "personalizadas y predictivas", es decir, capaces de sugerir el fármaco potencialmente más efectivo para cualquier paciente y predecir eventualmente si ocurrirá la enfermedad y cómo se desarrollará. (Ginsburg y Phillips. 2018).

1.6.1 Integración basada en ontología bioquímica

Los análisis integrados de resultados generados a través de múltiples plataformas ómicas son requeridos para interrogar los sistemas biológicos complejos. En los últimos años, los métodos de análisis de enriquecimiento tales como: análisis de enriquecimiento de sets de genes (GSEA)

han sido ampliamente usados para ayudar a interpretar los datos de expresión génica. Estos métodos facilitan la interpretación biológica integrando el conocimiento del dominio biológico (vías bioquímicas, procesos biológicos) con resultados de expresión génica.

Aunque, estas aproximaciones son altamente sensibles a las definiciones que constituyen una vía bioquímica o un set grupo de funciones moleculares relacionadas, ellas permanecen como un método clave para la integración de datos ómicos. Las herramientas existentes tales como: la plataforma análisis de enriquecimiento integrado de vías, iPEAP (Del Inglés integrative Pathways Enrichment Analysis Platform), y análisis integrado de vías en Metaboanalyst 3.013 apoyan la integración de diferentes plataformas ómicas a través de los análisis de enriquecimiento y análisis de sobrerrepresentación de vías.

1.6.2 Modelamiento de los datos ómicos en redes biológicas

Los análisis basados en redes son otro set de herramientas promisorias usadas para estudiar una variedad de mecanismos celulares y funcionales. Las redes biológicas representan conexiones complejas entre diversos tipos de componentes celulares como genes, proteínas y metabolitos. Estas redes se pueden utilizar para integrar o mapear múltiples resultados experimentales ómicos. Por ejemplo, SAMNetWeb¹⁵ y pwOmics¹⁶ soportan la integración de datos transcriptómicos, proteómicos e interactivos para el cálculo de redes biológicas, la visualización y el análisis de enriquecimiento funcional. Otros desarrollos lo constituyen las plataformas Metscape y Cytoscape. El primero, es un programa que proporciona visualizaciones intuitivas para redes de enriquecimiento de vías o redes de interacción proteína-proteína e incluso la visualización de redes, desde genes a metabolitos, en el contexto del metabolismo. Por otra parte, Cytoscape es un

proyecto de software de código abierto para integrar redes de interacción biomolecular con datos de expresión de alto rendimiento y otros estados moleculares en un marco conceptual unificado (Shannon et al, 2003)

Finalmente, MetaMapR ha sido usado para integrar la información de las reacciones enzimáticas con metabolitos con similitud estructural y similitud espectral de masas para generar redes metabólicas ricamente conectadas e identificar relaciones independientes de vías, incluyendo moléculas con estructura desconocida o función biológica (Grapov et al.,2015).

1.6.3 Análisis de correlación empírico

Los análisis basados en correlación son útiles para la integración de datos ómicos cuando no se conoce la estructura bioquímica y para integrar datos biológicos y otros metadatos. El paquete R apoya los análisis de correlación entre dos sets de datos altamente dimensionales a través de métodos tales como: análisis de componente principal disperso (PCAs), análisis de correlación canónica (rCCA) y análisis discriminante PLS, y el análisis correlación de redes de genes pesados (WGCNA).

Finalmente, los experimentos metabolómicos pueden requerir integración de múltiples instrumentos analíticos, métodos de procesamiento de datos, análisis estadísticos robustos, modelamiento predictivo basado en máquinas de aprendizaje y enriquecimiento de vías. El desarrollo de herramientas de análisis ómicas combina análisis estadístico y multivariado con el conocimiento del dominio bioquímico, tales como Metaboanalyst que son requeridos para permitir los análisis de datos ómicos y la integración.

La especificidad molecular y la sensibilidad de la espectrometría de masas son ideales para el mapeo de un amplio rango de proteínas. Esta información se complementa con la obtenida a partir de los análisis metabolómicos globales y ambas permitirán elucidar de forma precisa y comprensiva el comportamiento fisiopatológico en el tejido. Si bien, los estudios orientados a dilucidar los mecanismos moleculares y patofisiológicos que desencadenan la progresión a falla cardiaca han permitido avanzar en el entendimiento de la enfermedad, sin embargo aún no se conocen completamente por esta razón, y teniendo en cuenta, que se cuenta con explantes cardiacos, en este estudio se plantea realizar un análisis integrado diferencial en tejido miocárdico humano de pacientes con CCC y Cardiomiopatía dilatada no chagásica CNC. Este tipo de análisis tiene el potencial de identificar, cuantificar y caracterizar un grupo de proteínas y metabolitos, conocer cuáles proteínas están desreguladas en el estado de enfermedad e identificar vías metabólicas y de señalización involucradas en la patogénesis. El entendimiento de los sistemas biológicos complejos ha sido una pregunta frecuente para muchos investigadores.

2. Objetivos

2.1 Objetivo General

El objetivo fundamental de esta Tesis Doctoral consiste en realizar un análisis integrado diferencial del perfil proteómico y metabolómico del miocardio de pacientes con Cardiomiopatía Chagásica Crónica (CCC) y Cardiomiopatía no Chagásica (CNC) frente al control sano.

2.2 Objetivos Específicos

Determinar el perfil proteómico cuantitativo diferencial de proteínas en el miocardio entre las dos patologías (CCC y CNC) y control sano mediante marcaje isobárico con TMT utilizando espectrometría de masas acoplada a cromatografía líquida de alta presión.

Determinar el perfil metabolómico cuantitativo diferencial en el miocardio de pacientes con CCC, CNC frente a control sano mediante cromatografía líquida acoplada a espectrometría de masas en *tándem* (LC-MS/MS).

Realizar un análisis integrado *in silico* del perfil proteómico y metabolómico diferencial entre CCC y CNC utilizando el software IPA.

3. Materiales y Métodos

3.1 Aspectos éticos

Todos los pacientes involucrados en el estudio aceptaron participar y firmar de manera voluntaria el consentimiento informado. Los datos demográficos, epidemiológicos, tipo de medicación y resultados del electrocardiograma y de la fracción/ejección (FE), fueron recolectados a partir de la historia médica. El protocolo del estudio fue aprobado por el Comité de ética médica de la Universidad Industrial de Santander (Acta No: D-14 10586 de agosto 8 del 2014) y de la Fundación Cardiovascular de Colombia (Acta No 298). Todos los procedimientos experimentales y clínicos fueron realizados de acuerdo con los principios éticos para las investigaciones médicas en seres humanos expresados en la declaración de Helsinki y en su actualización más reciente (Fortaleza, 2013).

Para el grupo CCC: los criterios de inclusión fueron: Edad entre 40-75 años, con niveles de FE menores a 20 y las pruebas de anticuerpos contra antígeno crudo y recombinante de *T. cruzi* positivos (ELISA).

3.2 Recolección de las muestras

Para el análisis proteómico, este estudio incluyó seis explantes de corazón provenientes de pacientes con CCC, seis con CNC y seis de pacientes fallecidos sanos. Para el análisis metabolómico, los grupos incluyeron siete muestras en cada grupo. La muestra fue tomada del

ventrículo izquierdo, en cada tejido se seleccionaron áreas de 2 x 2 cm tanto en regiones fibróticas y regiones adyacentes a las áreas fibróticas. Subsecuentemente, las muestras de tejido cardiaco fueron almacenadas a $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$.

3.3 Análisis histopatológico

Las secciones de la pared anteroposterior del ventrículo izquierdo reservadas para el estudio histopatológico fueron procesadas en el laboratorio del Departamento de Patología de la Facultad de Salud, Universidad Industrial de Santander. Las muestras de tejido cardiaco fueron fijadas con formalina al 10%, posteriormente se obtuvieron dos porciones las cuales fueron incluidas en bloques de parafina. Se hicieron cortes histológicos de $5\text{ }\mu\text{m}$ de espesor, éstos fueron teñidos con Hematoxilina y Eosina (H y E). Los tejidos se observaron con ayuda de un microscopio óptico convencional usando los objetivos de 40X y 100X (Eclipse E100, Nikon). El análisis histopatológico incluyó la evaluación de diferentes características como hipertrofia, fibrosis y presencia de infiltrado inflamatorio. El grado de intensidad fue catalogado como leve, moderado y abundante, mientras la distribución fue indicada como focal o difusa. Por su parte, la fibrosis entendida como acumulación desproporcionada de colágeno fibrilar fue clasificada como reactiva (intersticial o perivascular) o reparativa.

3.4 Análisis proteómico

3.4.1 Homogenización del tejido, extracción y lisis de proteínas

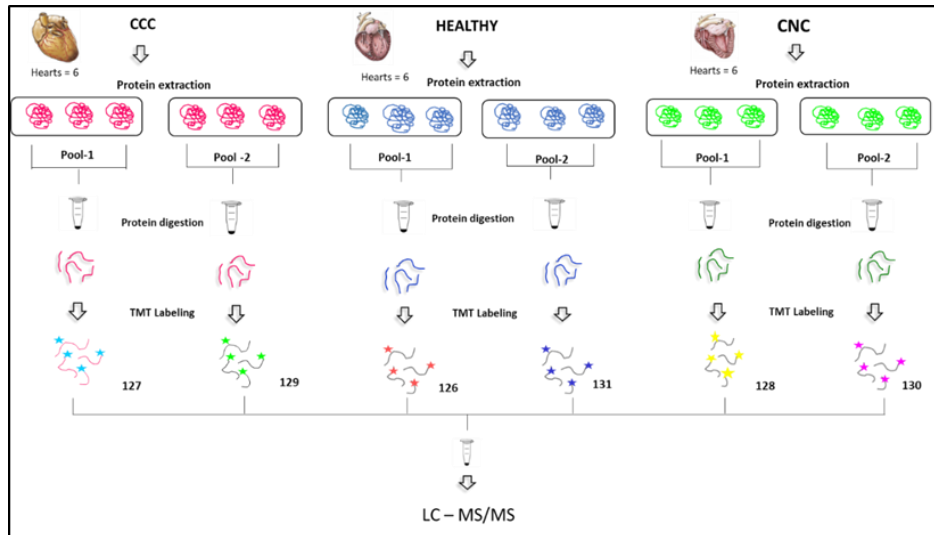
Las muestras de tejido aún congeladas fueron homogenizadas mediante maceración de fragmentos en un mortero con pilón bajo tratamiento de nitrógeno líquido. Para el proceso de extracción y lisis de proteínas se siguió el siguiente protocolo: 100 mg de homogenizado fueron colocados en un vial que contenía perlas de zirconio y 700 μ l de tampón de lisis, el cual contenía: 20Mm HEPES, 9M urea, 1 mM orto vanadato, 2,5 mM pirofosfato, 1 mM glicerofosfato de sodio y cóctel inhibidor de proteasas (Sigma Aldrich) (Weston, 2013). Posteriormente, se realizaron tres ciclos de homogenización de 40 seg a 4°C en un homogenizador de tejidos Beadbug (Benchmark Scientific). Posteriormente, el material no disuelto fue removido mediante centrifugación por 30 minutos a 14.000 rpm a 4°C. El sobrenadante fue transferido a un nuevo vial y fue almacenado a -80°C. Previamente, una alícuota fue utilizada para la cuantificación de proteínas mediante el método de Bradford.

3.4.2 Cuantificación de péptidos usando “Tándem Mass Tags” (TMT)

En este estudio se utilizó una aproximación proteómica de cromatografía líquida asociada a espectrometría de masas. Para la cuantificación se utilizó marcaje isobárico con TMT y para minimizar la variación biológica se realizó la combinación de tres muestras proteicas de cada condición para así obtener dos réplicas biológicas por cada grupo (Figura 11). y se siguió el siguiente esquema.

Figura 11.

Representación esquemática del diseño experimental empleado en el análisis proteómico cuantitativo.



Nota. 18 explantes cardiacos fueron recolectados, 6 explantes provenían de pacientes con CCC, 6 de pacientes con CNC y 6 de pacientes sin ninguna patología cardiaca (Grupo sano). Secciones de tejido de la pared anterior del ventrículo izquierdo de cada órgano fueron empleados para obtener extractos proteicos, luego se generaron dos viales, cada uno con la combinación de tres muestras por cada condición, éstas mezclas fueron marcadas usando un protocolo de marcaje isobárico (TMT) *six plex*. Cada muestra fue separada en fracciones y analizada en un espectrómetro de masas.

Para la digestión de proteínas, 40µg de cada condición fueron precipitados por el método del metanol/cloroformo. Los precipitados de proteínas fueron resuspendidos y denaturados en 20µl de 7M urea/2M tiourea /100mM trimetil amonio bicarbonato (TEAB) pH,7,5 y reducidos con 2µl de tris 2 carboxietil fosfina (TCEP, SCIEX) pH 8,0 a 37 °C por 60 min y seguido por 1µl de 200mM reactivo bloqueador de cisteínas (metilmetanotiosulfonato MMTS, Pierce) por 10 min a temperatura ambiente. Las muestras fueron diluidas a 140µl para reducir la concentración de la urea con 25mM de TEAB. Las digestiones fueron iniciadas adicionando 2µg de tripsina grado

secuenciación (Sigma Aldrich) a cada muestra en una proporción 1:20 (w/w) la cual fue incubada a 37 °C toda la noche en un agitador. Las muestras digeridas fueron secadas en un concentrador de vacío (Thermo Scientific) y los péptidos resultantes fueron subsecuentemente marcados usando **TMT Sixplex** marcaje isobárico a una concentración de 20µg/µl (Thermo Scientific, Rockford, IL, USA) de acuerdo con las instrucciones de la casa manufacturera como sigue:

Tabla 3.

Asignación de los diferentes reactivos de marcaje (tags) a los grupos de estudio.

Reactivo de Marcaje	Grupos	Reactivo de Marcaje	Grupos
TMT ⁶ -126	Sano 1	TMT ⁶ -129	CCC 2
TMT ⁶ -127	CCC 1	TMT ⁶ -130	CNC 2
TMT ⁶ -128	CNC 1	TMT ⁶ -131	Sano 2

3.4.3 LC-MS/MS

Para la separación cromatográfica, una alícuota de 1 µg de la mezcla marcada fue cargada en una precolumna PepMapTM 100 C18 AcclaimTM (Thermo Scientific) y eluida a una columna de fase reversa PepMap de 50cm de longitud, 75µm de diámetro interno y 2µm de tamaño para partículas (Thermo Scientific). La velocidad de flujo de la fase móvil fue establecida en 300 nL/min usando 0.1% de ácido fórmico en agua (solvente A) y 0.1% de ácido fórmico en acetonitrilo 100% solvente B). Los péptidos fueron separados en un gradiente de 120 min, (5 min de 3-7% solvente B, 95 min de 7%-25% solvente B, 14 min de 25%-60% solvente B, 1 min de 60%-95% solvente B y 5 min de 95% solvente B) y posteriormente ionizados utilizando ionización electrospray (nano Easy 1000, Thermo Scientific, Bremen, Alemania), empleando un voltaje de 2000V y 270 °C de temperatura capilar.

Los espectros de masas se adquirieron en un espectrómetro de masas Q Exactive (Thermo Scientific,) trabajando en modo de iones positivo. Los espectros de masas correspondientes al espectro de barrido completo (m/z 120 -1800) se obtuvieron en el Orbitrap con una resolución de 70.000 (m/z 200), a un valor de control automático de ganancia (AGC) $3e^6$ y un tiempo de inyección máximo (IT) de 100 ms. Se seleccionaron los 15 iones precursores más intensos para su fragmentación con una energía de colisión normalizada de 27 eV y los espectros masa/masa se adquirieron comenzando con una relación masa/carga (m/z) de 100, AGC $1e^5$, una resolución de 35000 (m/z 200) y un umbral de intensidad de $2e^4$, ventana de aislamiento de 1.6 m/z unidades y máximo IT de 100ms. Se desecharon los iones con carga única o sin asignación de carga. La ventana de exclusión dinámica se fijó en 30 s.

3.4.4 Análisis de datos de espectrometría de masas

Los datos crudos (*.raw) de espectrometría de masas (MS) fueron analizados con el software Max Quant versión 1.6.5.0 (Cox J and Mann, 2008) (www.maxquant.org) utilizando los protocolos estandarizados (Tyanova et al., 2016). Los archivos de los espectros se enfrentaron a la base de datos Homo sapiens (SwissProt TaxID=9606_y_subtaxonomias, retrieved 5 July 2017, 42183 entradas) y PD_Contaminante_2015_5. fasta, 298 entrada. Los parámetros de búsqueda para la identificación y cuantificación relativa de las proteínas fueron los siguientes: los péptidos se consideraron trípticos, se consideraron como modificaciones fijas: la carboxiamidometilación en el residuo de cisteína, etiquetado TMT en el extremo amino del péptido y el residuo de lisina, mientras que la oxidación en la metionina se consideró modificación variable.

La tolerancia de los iones parentales y sus precursores se fijó en 10 ppm y 0.02 Da respectivamente, permitiendo la ausencia de corte (*missed tryptic cleavage sites*) de 2. La identificación de los péptidos se basó en péptidos exclusivos de las proteínas (*Unique peptide*) y en péptidos compartidos por distintos grupos de proteínas (*Razor peptides*), estas identificaciones fueron validadas usando el algoritmo Percolator con una tasa de falso descubrimiento (*False Discovery Rate- FDR*) de Benjamin and Hochberg para péptidos y proteínas menor de 0.05 (Benjamini and Hochberg, 1995). La tasa de falsos descubrimientos (FDR, por sus siglas en inglés) representa la proporción de valores esperados que se desvían del resto de la población de proteínas (*outliers*) solo al azar frente al número total de *outliers* (Choi et al., 2008).

La cuantificación en experimentos con marcaje TMT se realiza midiendo las intensidades de los iones reporteros (fragmentos liberados por las etiquetas) en el modo MS en tándem (MS2) durante la fragmentación del péptido. Las señales de los iones reporteros liberados son indicadores de la abundancia de proteínas, por lo que la suma de los iones reporteros en cada canal es un indicador de la cantidad total de proteínas, de tal forma que se puede comprobar la consistencia de la señal total por canal.

3.4.5 Análisis y normalización de los datos proteómicos

Las señales de iones reporteros se corrigieron para las impurezas isotópicas, y sólo las proteínas con al menos dos péptidos únicos fueron consideradas para el análisis. Para corregir errores y eliminar posibles sesgos en los datos cuantitativos, se aplicó un método de normalización basado en la mediana (Weiner et al, 2022). En la aproximación con TMT, los péptidos más intensos en el barrido MS1 son seleccionados para subsecuente fragmentación (HCD) para generar

los espectros MS2. En esta segunda fragmentación se liberan los iones reporteros y, por tanto, se cuantifican los péptidos.

Cada ion reportero refleja la abundancia de un péptido en una muestra. Entonces, la intensidad de un ion reportero dado fue normalizada por la mediana de la intensidad total de todos los iones reporteros para cada péptido. Así, las intensidades normalizadas de los iones reporteros reflejan la abundancia relativa de un péptido a través de las muestras. Luego, las abundancias normalizadas de los péptidos asignados a una proteína dada fueron integrados para calcular la abundancia relativa de las proteína.

Para cada muestra, las abundancias de las proteínas fueron dadas como intensidades, las cuales fueron luego normalizadas por la mediana de las intensidades de las proteínas totales y transformadas a Log. Finalmente, la abundancia de cada proteína individual en un canal es dividida por su mediana correspondiente. Lo anterior lo podemos expresar usando la siguiente fórmula:

$$\tilde{V}_{ij} = \frac{V_{ij}}{\text{mediana}(V_i)}$$

Dónde: \tilde{V} indica la abundancia de la proteína normalizada.

V_{ij} denota el ratio de la abundancia de la proteína j en la muestra i .

Para identificar las proteínas expresadas diferencialmente un análisis comparativo de los valores de expresión relativa fue realizado entre los grupos CCC/Sano, CCC/CNC y CNC/Sano, y la expresión diferencial fue determinada mediante el log en base 2 del número de veces del cambio (*fold change*) entre CCC/CNC, CCC/Sano, CNC/Sano (Log_2 ratio CCC/CNC ≤ 0.67 ; ≥ 1.5). Después, algunos filtros fueron aplicados a los resultados de la cuantificación global para obtener la lista final de las proteínas más moduladas. a) Proteínas cuantificadas con un péptido único b) Proteínas que después de la prueba estadística *t test* usando el software R tuvieron valores de p

≤ 0.05 . Los valores perdidos fueron imputados. De los 139.217 espectros adquiridos en el experimento 138.617 fueron incluidos en la cuantificación.

3.4.6 Herramientas bioinformáticas utilizadas para el análisis proteómico

Los cambios proteómicos relativos y un análisis de agrupamiento jerárquico entre los grupos con CCC, CNC y controles sanos fueron visualizados en un **Heatmap** utilizando el software MeV (<http://www.multipleexperimentvisualization.com>).

El sistema de clasificación **Panther** versión 14.1 (<http://www.pantherdb.org/>) fue usado como herramienta para el análisis de ontología de genes (*Ontología gene*, GO) (Mi et al, 2019). Las proteínas identificadas fueron clasificadas basadas en: la función molecular, procesos biológicos y componentes celulares. El análisis de enriquecimiento para GO y anotaciones en KEGG utilizó el test exacto de Fisher. Además, las proteínas identificadas y cuantificadas se analizaron mediante biología de sistemas usando el programa **STRING** v 10.0 (www.string-db.org) con el fin de obtener la predicción de las funciones biológicas y el análisis de las interacciones proteicas. STRING es una base de datos que recoge las interacciones de proteínas conocidas y previstas, incluidas las asociaciones directas (físicas) e indirectas (funcionales) derivadas de la genómica, de experimentos de alto rendimiento, de coexpresión y de conocimientos previos publicados. En todos se aplicó un filtro de alta confianza (0.600). STRING utiliza el algoritmo MCL para hacer el agrupamiento de las proteínas. Este algoritmo de clustering emplea una matriz de distancia obtenida a partir de las puntuaciones globales de las cadenas (así, las proteínas que interactúan con una puntuación global más alta tienen más posibilidades de acabar en el mismo nodo). Además de la matriz de distancias, MCL acepta un parámetro llamado

"inflación" que también está indirectamente relacionado con la precisión del agrupamiento (mayor inflación -> más nodos se obtienen) (Brohée, y van Helden, 2006).

3.4.7 Inmunodetección de Proteínas

3.4.7.1 Anticuerpos primarios. Las características de cada anticuerpo utilizado en los ensayos de *western blot* se especifican en la Tabla 4.

Tabla 4.

Anticuerpos primarios utilizados en el Western Blot.

Anticuerpo	Proveedor	Referencia	Dilución	Especie
Anti-coactosina	Abcam	Ab11575	1:2000	Conejo
Anti Lumican	Santa cruz	SC166871	1:5000	Conejo
Anti-Anexina	Abcam	ab115770	1:2000	Conejo
Anti Asporina	Abcam	ab58741	1.1000	Conejo
Anti Coronina	Abcam	ab228795	1:5000	Conejo
Anti β -Actina	Abcam	ab227387	1.5000	Conejo

3.4.7.2 Anticuerpos secundarios. Los anticuerpos secundarios usados en los ensayos de esta Tesis Doctoral se muestran en la Tabla 5.

Tabla 5.

Anticuerpos secundarios utilizados en Western Blot.

Anticuerpo	Proveedor	Referencia	Dilución	Especie
Anti-IgG de conejo H&L, marcada con peroxidasa (HRP)	Abcam	Ab7090	1:10000	Cabra

Anticuerpo	Proveedor	Referencia	Dilución	Especie
Anti-IgG de ratón H&L, marcada con peroxidasa (HRP)	Santa cruz	Ab205719	1:5000	Cabra
Anti-IgG de conejo marcada con peroxidasa	Dako C.	P0449	1:10000	Ratón

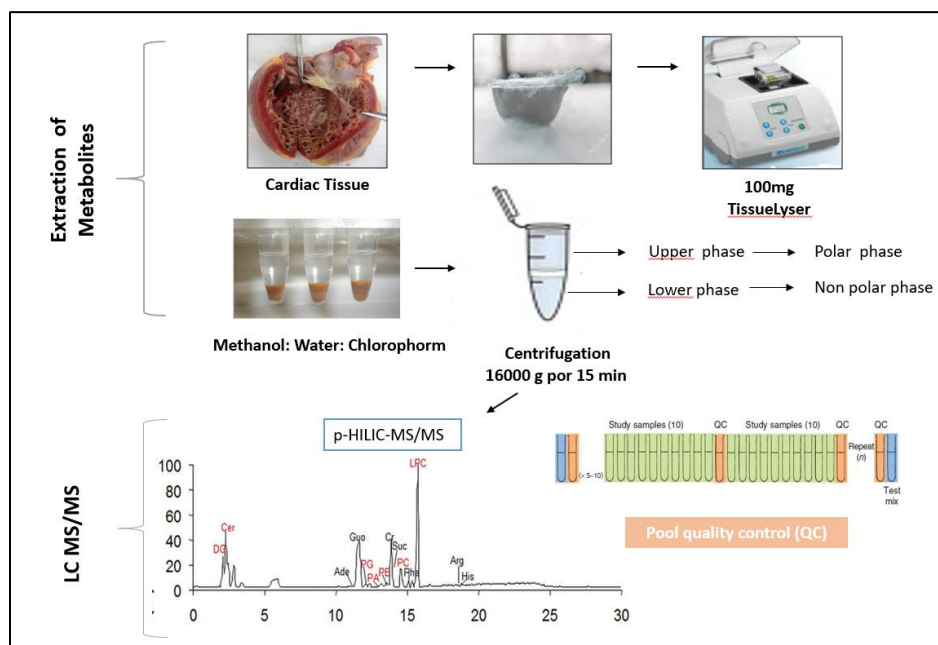
3.4.7.3 Western Blot. 100 mg de tejido miocárdico de cada muestra preservada a -80°C fueron usados para la extracción de proteínas totales. La concentración de proteínas fue determinada por el método de Bradford (Bio Rad Protein assay). Las proteínas ($2.0\ \mu\text{g}/\mu\text{l}$) fueron separadas mediante SDS PAGE y transferidas a membranas de nitrocelulosa (Amersham Hybond, Western Blotting) siguiendo el método descrito en (McDonough et al., 2002). Las membranas fueron bloqueadas con PBS- leche (5%) por 1h a temperatura ambiente e incubadas con los anticuerpos específicos mono o policlonales de las proteínas seleccionadas, durante toda la noche a 4°C a temperatura ambiente. Después, se realizaron tres lavados con búfer fosfato salino - Tween (PBST) en agitación constante por 5 min cada lavado. Luego, las membranas fueron incubadas con los anticuerpos anti-IgG de conejo conjugados con HRP durante 1h a temperatura ambiente. Al finalizar la incubación se removieron los restos de anticuerpo secundario con tres lavados con PBST en las mismas condiciones descritas para el primer lavado. Finalmente, las membranas fueron reveladas usando $800\ \mu\text{l}$ de reactivo SuperSignal West Pico (Pierce) y fueron visualizadas en el sistema de adquisición de imágenes ChemiDoc (Life Science Research BioRad). La abundancia de las proteínas mediante WB se cuantificó mediante densitometría usando el software de análisis QuantityOne 1D v4.6 (BioRad, CA, EUA).

3.5 Análisis metabólico

A continuación, en la figura 12 se detalla el flujograma aplicado a las muestras de tejido para la obtención de los metabolitos.

Figura 12.

Flujograma del procedimiento para la extracción de metabolitos a partir de tejido cardiaco.



Nota. El proceso de extracción de metabolitos involucró: homogenización del tejido cardiaco, extracción de metabolitos mediante solución de agua, cloroformo y metanol, obtención de la fase polar y subsecuente separación en la columna pHILIC, finalmente, análisis de las muestras en el espectrómetro de masas en modo ion positivo y negativo.

3.5.1 Extracción de los metabolitos a partir del tejido cardiaco

Aproximadamente, 5 g de tejido cardiaco fueron congelados en nitrógeno líquido y almacenados hasta su análisis. Los metabolitos fueron extraídos usando el método metanol -

cloroformo descrito por Le Belle et al (2002). 100 mg obtenidos de la muestra original fueron empleados para la extracción de los metabolitos. Inicialmente, se procedió a triturar el material bajo tratamiento de nitrógeno líquido utilizando un mortero con pistilo, luego este homogenizado se dispuso en un vial de 2ml con tapa rosca, al cual se le adicionaron 600 µl de una solución fría de metanol-cloroformo (2:1). Para lisar las muestras y asegurar una óptima extracción, los tubos con perlas de zirconio y la mezcla fueron colocados en un equipo homogenizador de tejidos (Quiagen, Hilden, Alemania) durante 10 min a 4 °C a 25 Hz. Posteriormente, la mezcla se trasladó a un nuevo vial al cual se le adicionaron 200 µl de una solución agua-cloroformo, luego, las muestras fueron agitadas por 30 seg en un vórtex y centrifugadas a 13,200 rpm por 25 min. Después de la centrifugación, las fracciones acuosa (capa superior) y orgánica fueron alicuotadas por separado en tubos eppendorf, y almacenadas a -80C hasta su análisis.

3.5.2 Cromatografía líquida (pHILIC) /Espectrometría de masas (LC-MS)

Para la separación y detección de los metabolitos se utilizó un análisis de cromatografía líquida (LC) acoplado espectrometría de masas (MS). El procedimiento se llevó a cabo mediante cromatografía líquida de separación rápida (RSLC) en el sistema cromatográfico Ultimate 3000 Thermo Fisher Scientific, utilizando una columna ZIC-pHILIC (150mm x 4,6mm,5µm, Merck Sequant).

El método de gradientes tuvo una duración de 106 min por muestra. Se utilizó la combinación de dos fases móviles:

- Solvente A: carbonato de amonio 20 mM en agua (A)
- Solvente B: acetonitrilo.

La columna fue mantenida a 30 °C durante todo el proceso y el método de elución se describe en la Tabla 6.

Tabla 6.

Protocolo de gradiente empleado en la separación cromatográfica.

Tiempo (minutos)	Flujo (ml/min)	Solvente A	Solvente B
0-3	0.3	20%	80%
4- 30	0.3	80%	20%
31-36	0.3	92%	8%
37	0.3	20%	80%

El volumen de inyección fue de 10µl y las muestras fueron mantenidas a 5 °C antes de la inyección.

Las muestras fueron analizadas sobre el espectrómetro de masas Q Exactive (Thermo Scientific) en el Instituto Glasgow Polyomics, Universidad de Glasgow, Reino Unido. El espectrómetro de masa fue operado en el modo de iones positivo y negativo. En cuanto a los parámetros de ionización por ESI el voltaje de ionización por electro pulverización fue de +3,5 kV para modo de iones positivo y negativo y la temperatura capilar se estableció a 320 °C. Los espectros de masas correspondientes al espectro de barrido completo (m/z 70 -1050) se obtuvieron en el orbitrap con una resolución de 70.000 (m/z 200), a un valor de control automático de ganancia (AGC) 3e6 y un tiempo de inyección máximo (IT) de 100 ms.

El espectrómetro de masas fue calibrado con soluciones de calibración que abarcaron un amplio rango de masa, se incluyeron: Thermo Calmix (Pierce™ Thermo Scientific) con masas inferiores a m/z 138, butilamina (C₄H₁₁N) para el modo ionización positiva (m/z 74.096426) y COF3 para el modo ionización negativa (m/z 84.9906726).

3.5.3 Control de calidad para la monitorización de experimentos metabólicos

Todas las muestras del experimento fueron analizadas en el mismo lote analítico y la calidad de la cromatografía y reproducibilidad de la señal fueron chequeadas mediante análisis de calidad de las muestras control, del estándar interno y los cromatogramas de corriente iónica total. Con el objetivo de evaluar la calidad de los datos durante su adquisición se analizaron las muestras mezcladas en un único vial como control de calidad (*QC*, del inglés *Quality Control*) a lo largo del proceso analítico. Esta combinación fue obtenida a partir de alícuotas biológicas de cada muestra. Se inyectaron muestras *QC* cada seis muestras para controlar que la variación analítica fuera mínima, para proporcionar una medida sobre la estabilidad y el funcionamiento del sistema y reproducibilidad de los datos. Al mismo tiempo, el orden de inyección de las muestras fue aleatorizado para evitar que se solaparan los efectos, es decir no se inyectaron todas las muestras correspondientes a un grupo de forma seguida.

Así mismo, fue utilizada una solución estándar que contenía 200 metabolitos (Apéndice A) los cuales cubrían un rango amplio de vías metabólicas, esta solución fue corrida al inicio de cada lote de muestras para facilitar la identificación de los metabolitos.

3.5.4 Análisis de Datos

Los análisis metabólicos generan gran cantidad de datos caracterizados que contienen un número de variables mucho más elevado que el número de muestras. El procesamiento de estos datos involucró tres etapas: i) procesamiento de datos, ii) tratamiento de datos y iii) análisis estadístico.

3.5.4.1 Procesamiento de datos. Debido a la naturaleza tridimensional del dato (tiempo de retención, valor de masa carga e intensidad de los iones) el análisis estadístico no se puede realizar directamente y por tanto, se hizo necesario obtener una matriz de datos bidimensional, la cual será utilizada en los análisis estadísticos posteriores. La matriz bidimensional consta de pares de RT-m/z que juntos definen un marcador detectado en una dimensión y las muestras en la otra. Para cada marcador y muestra se calcula la intensidad del ion, representada por la integración del área bajo la curva del correspondiente pico.

Todos los archivos de los datos “crudos” fueron convertidos al formato mzXML. Los datos fueron procesados y analizados usando el software PiMP (<http://polyomics.mvls.gla.ac.uk>). La estrategia de procesamiento de PiMP involucró los algoritmos de filtrado, detección de picos y alineamiento de picos entre las diferentes muestras.

Durante la fase filtrado se estableció un determinado umbral (“threshold”) con el objetivo de eliminar el ruido de base. Por su parte, en la etapa detección de picos se identificaron los picos cromatográficos, los cuales se definieron por: tiempo de retención y su valor m/z, cabe señalar que la detección de picos se realizó para cada muestra, por esta razón en la fase de alineamiento se asociaron todos los marcadores del mismo ion que aparecen en las diferentes muestras. Al finalizar este proceso se obtuvo una tabla de iones que contenía la masa exacta, el tiempo de retención y la intensidad en las muestras analizadas para cada uno de los iones.

3.5.4.2 Tratamiento de los datos. Previo al análisis estadístico de los datos generados en la fase anterior, es necesario obtener una distribución de los datos más adaptada a la curva de normalidad. Los procedimientos son la transformación logarítmica, el centrado (convierte todas las fluctuaciones de las magnitudes de los iones alrededor de cero, en lugar que lo hagan alrededor

de su media) y el escalado. El objetivo del método escalado es proporcionar la misma importancia (peso) a todos los marcadores, independientemente de su abundancia. Así los métodos de escalado dividen cada marcador por un factor (el factor de escalado), el cual será diferente para cada muestra.

3.5.4.3 Análisis estadísticos de datos metabolómicos. Los datos obtenidos mediante análisis metabolómico se caracterizan por ser multidimensionales lo cual hace difícil su comprensión y visualización con los métodos estadísticos tradicionales. Por esta razón, se utilizan análisis multivariantes para extraer la información relevante, dado que estos análisis tienen la capacidad de descomponer datos complejos en estructuras más simples y potencialmente interpretables (Trygg et al., 2007).

3.5.4.3.1 Análisis de componentes principales (PCA). Los análisis de PCA fueron realizados en el Software Metaboanalyst con un nivel de confianza del 95%. Este análisis proporcionó una visión general de la distribución de todas las muestras analizadas.

3.5.5 Identificación de los metabolitos y análisis de vías

Los metabolitos detectados por LC-MS se caracterizaron utilizando las variables: tiempo de retención, relación masa-carga (m/z) y, en algunos casos, por el patrón de fragmentación. La identificación de los metabolitos fue determinada mediante comparación de estas variables con las correspondientes de los estándares incluidos en la corrida, o en librerías de espectrometrías de masas públicas (disponibles en internet). La información de la masa de los metabolitos fue

pareada con la información contenida en las bases de datos de Metaboloma Humano (HMDB, del inglés Human Metabolome Database; <http://www.hmdb.ca>), Metabolitos y entidades químicas (METLIN, del inglés Metabolite and Chemical Entity Database; <http://metlin.scripps.edu/>) y Enciclopedia “Kyoto” de Genes y Genoma (KEGG, del inglés Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes; [http:// www.kegg.](http://www.kegg.)). La base de datos KEGG, permite posicionar los metabolitos en sus correspondientes rutas metabólicas y, de este modo, estudiar posibles relaciones metabólicas entre ellos (Kanehisa et al., 2012). Adicionalmente utilizando la plataforma MetaboAnalyst (versión 4.0); <http://metaboanalyst.ca> se realizó un análisis de enriquecimiento (MSEA) y un análisis de vías (MetPA) en aquellos metabolitos que cambiaron significativamente entre las comparaciones.

3.5.5.1 Niveles de identificación. La Iniciativa de Estándares Metabolómicos (Por sus siglas en inglés, MSI), (MSI Board Members, 2007), ha definido cuatro niveles de identificación de los compuestos. Las identificaciones nivel I o también conocidas como “metabolito identificado” son dadas cuando más de una característica corresponden a las de un auténtico estándar por Ej: masa y tiempo de retención, y además esta sustancia ha sido adicionada en la misma corrida con la muestra. El nivel 2 ocurre cuando únicamente una de las dos características corresponde con las del estándar, y se denominan “anotados” (Goodacre et al., 2007). En este análisis, se consideraron únicamente los metabolitos identificados, aquellos compuestos para los cuales el patrón de fragmentación y el tiempo de retención eran idénticos a los de los metabolitos en estado puro presentes en la solución estándar.

3.6 Análisis integrado de resultados proteómicos y metabolómicos

Para comparar e integrar los datos de dos diferentes resultados ómicos, se utilizó el software Ingenuity pathways analysis (IPA) (Quiagen). El conjunto de datos proteómicos subido al software IPA consistió de dos archivos para cada componente y condición. Un archivo contenía únicamente la lista de proteínas y su correspondiente $\text{Log}_2 \text{fold change}$ (La relación logarítmica de los valores de expresión de un gen en dos condiciones diferentes). El segundo archivo de entrada contenía la lista de proteínas que fueron diferencialmente expresadas para cada condición. Archivos similares fueron generados para los datos metabolómicos. Para adquirir las vías canónicas y las redes de interacción molecular el valor $(-\log p)$ y el valor de puntuación fueron usados respectivamente para seleccionar los resultados más significantes.

3.7 Análisis estadístico

Para la evaluación de la significancia estadística entre los grupos, se utilizó la prueba *t de student*. En todos los análisis se consideraron significativos todos los valores $p \leq 0.05$. Para el análisis estadístico un análisis de componente principal fue realizado para explorar la distribución global de la huella proteica en el grupo con CCC, CNC y el grupo sano.

Para identificar las proteínas expresadas diferencialmente, se realizó un gráfico volcano el cual estuvo basado sobre el valor de p de *t* test y el valor del \log_2 del número de veces del cambio (fold change) usando el software Perseus v2.0.3.1 (Tyanova et al., 2016). Se establecieron como proteínas diferenciales aquellas que tenían una diferencia significativa de umbral más o menos 1. Un valor de $p \leq 0.05$ fue considerado estadísticamente significativa.

Un test no paramétrico fue usado para comparar la señal de la intensidad del western blot. El software MeV fue usado para preparar los gráficos.

4. Resultados

4.1 Características epidemiológicas de los grupos CCC, CNC y grupo control sano en el análisis proteómico

En este estudio se analizó tejido de la pared del ventrículo izquierdo de explantes cardiacos provenientes de 6 pacientes con CCC y 6 con CNC. Además, fueron incluidos 6 pacientes que al momento de la muerte no presentaron enfermedad cardiaca, este grupo fue denominado grupo control sano. La información relacionada con la edad, sexo y otras variables clínicas son presentadas en la tabla 7. Todos los participantes pertenecieron al grupo étnico mestizo. Cinco de los 6 participantes en cada grupo fueron hombres. La edad promedio en el grupo CCC y CNC fue 51 y 54,5 años respectivamente, mientras para el grupo control sano fue 30 años. Todos los pacientes con CCC exhibieron valores bajos en la tasa de fracción eyección, concordante con un estado de falla cardiaca. Todos los pacientes con CCC recibieron agentes inotrópicos intravenosos, β -bloqueadores, diuréticos y terapia inmunosupresora. Tres pacientes recibieron dispositivos de asistencia ventricular antes del trasplante Tabla 7.

Tabla 7.

Características clínicas de los participantes del estudio.

Variables	CCC	CNC	SANO
Número de pacientes	6	6	6
Sexo Femenino	1	1	1
Edad (años)*	51 [42-55]	54,5 [51-59]	30 [20-33]
Presión sistólica (mmHg)	107[100-130]	105 [98-132]	-
Presión diastólica (mmHg)	68[64-77]	70[65-78]	-
Fracción de eyección ventricular izquierda (FEVI) (%)	10[10-15]	15 [12-25]	-
valoración funcional de insuficiencia cardiaca NYHA clase III-IV n (%)	6(100%)	6(100%)	-
Dispositivo de asistencia para ventrículo izquierdo n (%)	3(50%)	0 (0%)	-
Parámetros clínicos			
BNP (pg/ml)	729 [587-980]	311[283-355]	-
GOT (U/L)	26 [22.5 -29.41]	17[15-21]	-
GPT (U/L)	34.5 [23.0- 84.0]	22[17-28]	-
CPK total (U/L)	1118.1[404-1176.47]	756[678-632]	-
CPK-MB (U/L)	33.8[29.0-33.9]	28[25-36]	-
Creatinina (mg/dl)	1.07 [0.88 -1.40]	1.0[0.9-1.1]	-
Tratamiento farmacológico			
Inhibidores de la ECA	3(50%)	3(50%)	-
Bloqueadores de RA (BRA)	2(33%)	2(33%)	-
Beta bloqueadores	6(100%)	3 (50%)	-
Diureticos	6(100%)	5(83,3%)	-
Agentes inotrópicos	6(100%)	5(83,3%)	-
Anticoagulantes	4(66,6 %)	4(66.6%)	-
Estatinas	1(16%)	2(33%)	-
Ivabradina	1(16%)	2(33%)	-
Anestésicos	6(100%)	6(100%)	-
Terapia inmunosupresora	6(100%)	6(100%)	-

Nota. Abreviaturas: FEVI: fracción de eyección ventricular izquierda, NYHA: clase funcional de la asociación del corazón de Nueva York, BNP: péptido natriurético atrial, GOT: aspartato aminotransferasa, GPT: transaminasa glutámico-pirúvica, CPK: creatina quinasa, ECA: enzima convertidora de angiotensina, BRA: bloqueadores de receptores de angiotensina. Las variables numéricas son reportadas como mediana y rango intercuartil.

4.2 Análisis histopatológico del tejido cardiaco

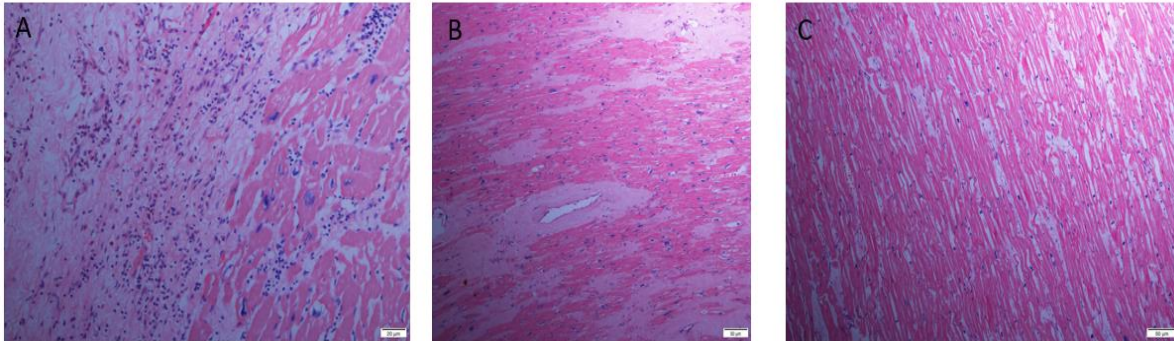
La imagen microscópica de las secciones de tejido miocárdico de los grupos CCC, CNC y control sano se observa en la figura 13. El grupo con CCC mostró miocarditis activa crónica, caracterizada por abundante infiltrado inflamatorio de tipo mononuclear compuesto principalmente por linfocitos, monocitos, células plasmáticas, histiocitos y escasos eosinófilos. La distribución del infiltrado se caracterizó por ser difusa y no uniforme, principalmente entre las áreas de fibrosis y áreas con fibras miocárdicas preservadas (Figura 13A). Cuando se compararon estos aspectos (grado de abundancia y distribución del infiltrado) entre los grupos CCC y CNC se observaron diferencias significativas ($p=0.0028$ y $p=0,002$) respectivamente (Figura 13A) (Apendice B). Cabe señalar que en el grupo CNC se observó escaso infiltrado inflamatorio con distribución tipo focal (Figura 13B,14C).

En relación con la fibrosis, ésta fue observada tanto en pacientes con CCC como CNC, mostrando siempre un patrón de distribución difusa, sin embargo, el grado de fibrosis fue significativamente mayor en el grupo con CCC ($p<0.027$). Con respecto a los tipos de fibrosis perivascular e intersticial, ambas estuvieron presentes, sin embargo, la fibrosis perivascular fue menos intensa en el grupo con CNC (Figura 13B,14C).

En las fibras miocárdicas viables se detectaron dos tipos de modificaciones hipertrofia y elongación. Estas alteraciones se observaron en ambos grupos, sin embargo, difieren en cuanto a localización e intensidad ($p=0.002$) (Apendice B).

Figura 13.

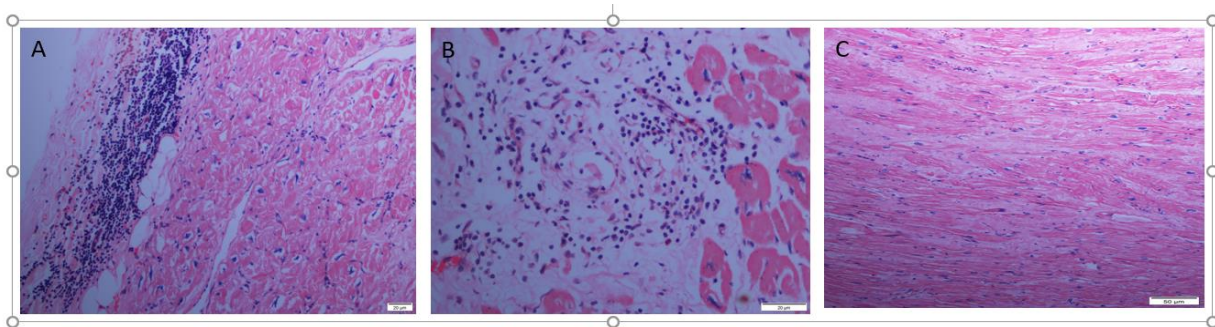
Imágenes representativas de secciones de tejido miocárdico.



Nota. A) Sección del ventrículo izquierdo de tejido cardiaco con CCC. En la imagen se observa abundante infiltrado inflamatorio de tipo linfocitario y predominio de áreas blancas representativas de severa fibrosis de tipo intersticial. B) Sección del ventrículo izquierdo de tejido cardiaco con CNC. En la imagen las áreas blancas representan áreas con abundante fibrosis intersticial y perivascular, escaso infiltrado inflamatorio e hipertrofia nuclear. C) Sección del ventrículo izquierdo de tejido sano.

Figura 14.

Histopatología de secciones de tejido miocardio (Ventrículo izquierdo) teñido con hematoxilina & eosina.



Nota. Las imágenes A y B corresponden a tejido miocárdico de pacientes con CCC. A) Abundante infiltrado inflamatorio en la superficie epicárdica. B) Mayor detalle del infiltrado inflamatorio e intensa fibrosis de tipo perivascular en tejido cardiaco con CCC. C) Tejido miocárdico correspondiente al grupo CNC, se observa fibrosis intersticial, algunos núcleos irregulares aumentados de tamaño y ausencia de infiltrado inflamatorio.

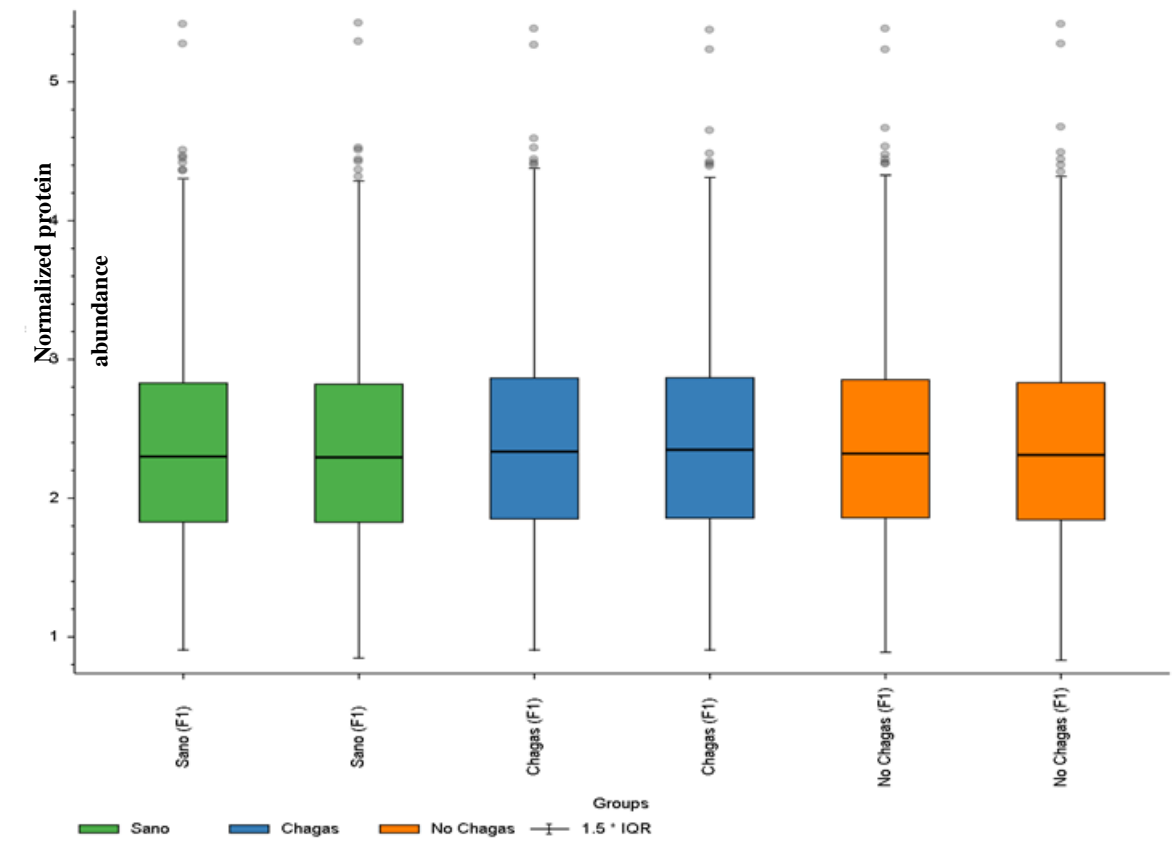
4.3 Análisis proteómico mediante espectrometría de masas

El análisis realizado en esta tesis corresponde a un análisis proteómico cuantitativo, masivo, basado en marcaje mediante etiquetas de masa isobárica (TMT). Esta aproximación permitió la identificación y cuantificación simultánea del proteoma soluble del tejido miocárdico (ventrículo izquierdo) de seis pacientes con CCC, seis con CNC y seis controles sanos.

Inicialmente, y previo al análisis cuantitativo, se evaluó la calidad del conjunto de los datos, en términos de abundancia de las proteínas entre las muestras y en cada canal. En la figura 15 se evidencian niveles similares de la abundancia de las proteínas después de la normalización.

Figura 15.

Gráfico de cajas con datos de expresión posterior a la normalización.



Nota. Diagrama de cajas de los datos de expresión después de la normalización. El eje X presenta las diferentes muestras, y el eje Y presenta el valor de abundancia de las proteínas. La línea negra en cada caja representa la mediana de expresión para cada muestra. Tras el preprocesamiento, las medianas de expresión fueron similares en todas las muestras.

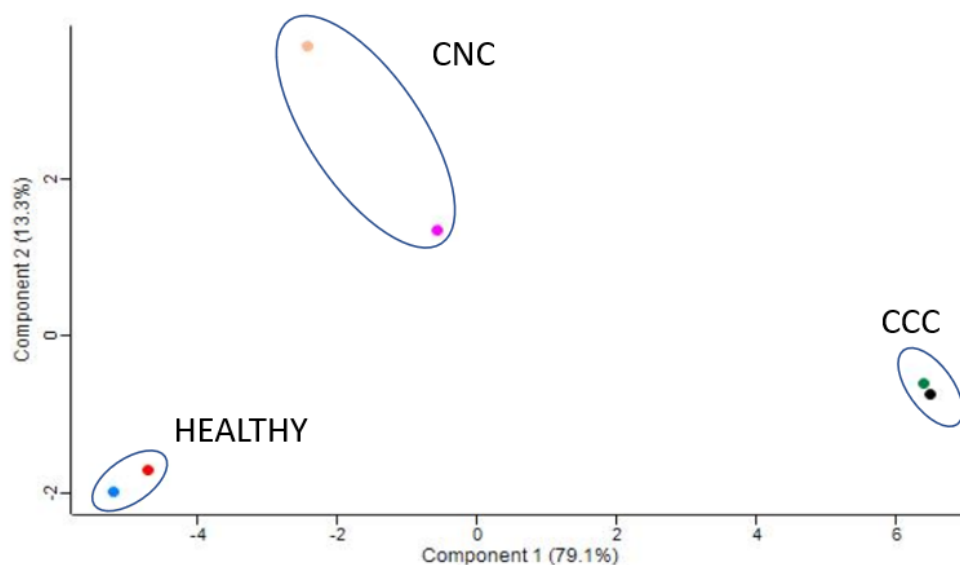
En este estudio se identificaron en total 2.558 proteínas en todos los tres grupos, de las cuales 1915 presentaron un FDR menor 1% en al menos dos péptidos únicos y 313 con un único péptido (no redundante), finalmente 1854 proteínas fueron cuantificadas y consideradas para análisis posteriores. L).

Una de las estrategias para identificar variaciones entre diferentes condiciones es detectar similitudes o diferencias entre los patrones de expresión de las proteínas usando análisis de componente principal (PCA). El PCA es un análisis multivariado no supervisado y permite observar la tendencia en un conjunto de datos, es decir cómo se agrupa cada subconjunto experimental.

EL PCA mostró una clara distribución entre los tres grupos (Figura 16). El grupo CCC se diferenció muy bien del resto de datos, indicando variaciones obvias del perfil del proteoma entre los tejidos CCC, CNC y control sano.

Figura 16.

Análisis de componente principal.

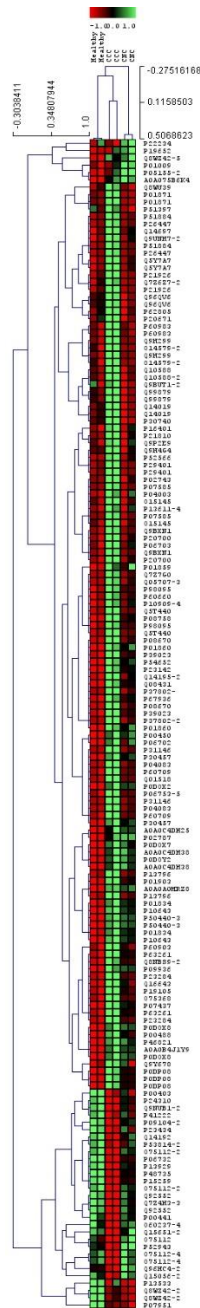


Nota. Las elipses representan el promedio \pm desviación estándar para cada grupo. Los datos de entrada correspondieron a una matriz con la intensidad de la señal de cada proteína y la identificación del marcaje en cada muestra. El PCA muestra en el eje X el valor de la componente 1 (PC1) 79.1% y en el eje Y el valor de la componente 2 (PC2) 13.3%. Nuestros resultados mostraron que el 92,4% de la varianza se observa en los dos primeros componentes principales (PC).

Por otro lado, para explorar el patrón de variación de los niveles de expresión relativa de las proteínas expresadas diferencialmente (PED) se realizó un mapa de calor (Heatmap). Un Heatmap es la representación gráfica de los datos donde los valores individuales son representados como colores, las filas representan los genes o proteínas y las columnas las condiciones. Cada nivel de expresión se representa como un cuadrado de color en la posición correspondiente a su proteína y a su condición. Además, se realizó un análisis de agrupamiento jerárquico no supervisado, por lo tanto, el Heatmap combinó los datos de agrupamiento en función de la distancia euclidiana entre las muestras y los niveles de expresión. El agrupamiento jerárquico mostró que los niveles de expresión de las proteínas difirieron significativamente entre los grupos (Figura 17).

Figura 17.

Mapa de calor y análisis de agrupamiento jerárquico de las proteínas expresadas diferencialmente cuando se comparó el grupo de pacientes con CCC, CNC y control sano.



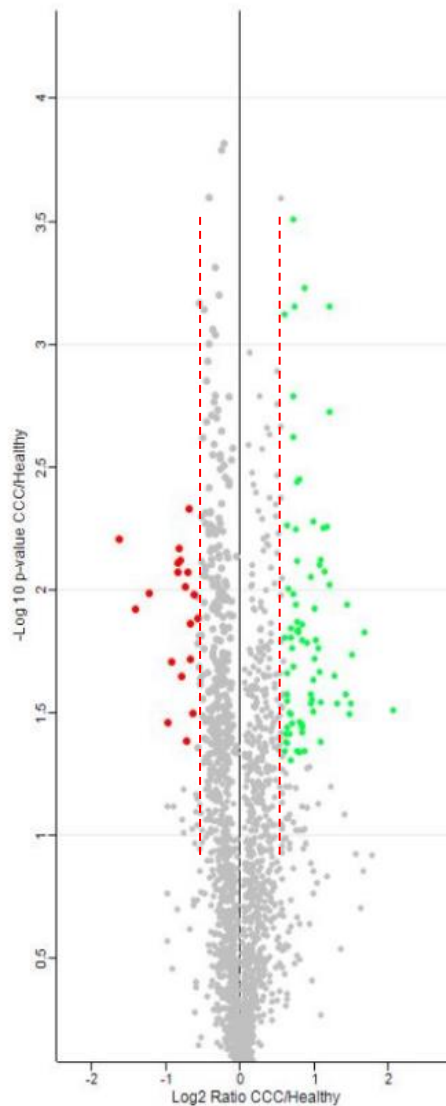
Nota. Cada fila representa una proteína expresada diferencialmente y cada columna una condición. La escala de color ilustra el nivel relativo de expresión de las proteínas expresadas diferencialmente: rojo indica un alto nivel de expresión mientras el verde indica un bajo nivel de expresión relativa.

4.3.1 Análisis de expresión diferencial del proteoma de tejido cardiaco humano en la comparación CCC vs sano

Para determinar el perfil de regulación proteica asociada al proceso patológico, se comparó el proteoma del tejido enfermo frente al tejido sano. En la comparación CCC vs sano, 96 proteínas fueron identificadas con expresión diferencial, es decir, con un nivel de expresión relativa mayor o igual a 1.5 y menor o igual a 0.67 (Log_2 fold change de ≥ 1.5 ; ≤ 0.67) y con un valor de significancia estadística de $p \leq 0.05$. De estas, 78 proteínas mostraron expresión aumentada y 18 exhibieron expresión disminuida (Figura 18, Tabla 8 y 9). En las tablas 8 y 9 se muestran con detalle las proteínas que están sobreexpresadas e inhibidas de forma significativa, para un valor ajustado de p inferior a 0.05. Entre las proteínas más sobreexpresadas estuvieron: histona H1.5 (HISTH1), actina citoplasmática 2 (ACTG1), lumican (LUM), coronina 1 alfa (CORO1A), asporina (ASP) y colágeno alfa entre otras. Mientras que la isoforma 2 de la proteína 3 de unión a LIM (LDB3), proteína ribosomal 28S mitocondrial (MRPS27), fueron reguladas a la baja (Tabla 9).

Figura 18.

Gráfico Volcano en la comparación CCC/sano.



Nota. En la gráfica cada proteína es representada por un punto cuya posición espacial está dada por su nivel de expresión y su significancia estadística. En el eje X se muestra el log 2 de la expresión relativa entre el grupo con CCC y el grupo control sano ($\log_2(\text{CCC}/\text{sano})$), mientras en el eje Y observamos el $-\text{Log}_{10}$ del valor de p. Los puntos de color rojo y verde representan las proteínas inhibidas y sobreexpresadas de forma significativa respectivamente. Las proteínas que no presentaron cambios significativos se representan en color gris.

Tabla 8.

Proteínas sobrepresadas significativamente en la comparación CCC vs sano.

No proteína	Identificación (UniProtKB)	Nombre de la Proteína	Símbolo del gen	Cubrimiento de secuencia	Valor -Log p	Log ₂ CCC/sano (≥1.5)
1	P16401	Histona H1.5	HIST1H1B	53,5	1,51373	2,05436
2	P63261	Actina, citoplasmática 2	ACTG1	75,1	1,83081	1,66666
3	P0DP08	Cadenas pesadas de Ig (region V)	IGHV4-61	12,1	1,73692	1,49953
4	P51884	Lumican	LUM	61,2	1,53657	1,48444
5	Q7Z7G0	Proteína de unión a Nesh (miembro3)	ABI3BP	7,5	1,49358	1,46721
6	P31146	Coronina-1A	CORO1A	85,1	1,94011	1,43441
7	Q9BXN1	Asporina	ASPN	55,4	1,57339	1,41394
8	Q05707-3	Colágeno alfa-1(XIV)	COL14A1	25,8	1,54036	1,30438
9	P98095	Fibulina-2	FBLN2	29,5	1,53863	1,29771
10	Q14019	Coactosina	COTL1	49	1,65256	1,26831
11	P08670	Vimentina	VIM	72,7	3,1548	1,20621
12	Q9Y678	Coatomero subunidad gamma-1	COPG1	88,8	2,02235	1,20246
13	IGHG3	Cadena pesada de la Ig gamma (región III)	IGHG3	59,4	2,72544	1,19627
14	P02743	Proteína amiloide A1 en suero	APCS	59,3	2,25914	1,16295
15	P21810	Biglicano	BGN	19,7	2,07415	1,1317
16	Q9H4G4	Proteína 1 relacionada a patogenesis de las plantas asociada a Golgi	GLIPR2	31,6	2,25398	1,11623
17	IGKC	Ig kappa cadena constante	IGKC	64,1	1,38158	1,0915
18	P39023	proteína ribosómica 60S L3	RPL3	48,1	2,12458	1,09015

No proteína	Identificación (UniProtKB)	Nombre de la Proteína	Símbolo del gen	Cubrimiento de secuencia	Valor -Log p	Log ₂ CCC/sano (≥1.5)
19	P07585	Decorina	DCN	19,7	1,54445	1,07806
20	Q5Y7A7	Antígeno HLA clase II DRB1-13	HLA-DRB1	28,6	2,10296	1,07512
21	P52566	Inhibidor de disociación de Rho GDP 2	ARHGDI B	16,5	1,66533	1,07062
22	LCP1	Plastina-2	LCP1	35,2	1,76602	1,05527
23	IGLL5	Inmunoglobulina lambda-polipéptido 5	IGLL5	27,4	1,79796	1,0108
24	BST1	proteína 3 rica en ácido glutámico dominio SH3	SH3BGRL 3	56,5	1,719	1,00732
25	Q9H299	componente complementario 7	C7	21,8	1,92297	0,994978
26	P10643	ADP-ribosil ciclasa	BST1	21,1	1,63447	0,992998
27	GATM	Glicina aminotransferasa mitocondrial	GATM	18,9	2,27888	0,990497
28	P04003	Proteína de unión a C4b cadena alfa	C4BPA	58,8	1,50463	0,988973
29	P26447	Proteína S100-A4	S100A4	56,8	1,5552	0,969912
30	P54652	proteína 2 de 70 kDa relacionada con el choque térmico	HSPA2	3,4	2,05298	0,955222
31	P00488	Factor de coagulación XIII cadena A	F13A1	17,3	1,57613	0,947701
32	P30457	Antígeno de histocompatibilidad clase I cadena alfa A-66	HLA-A	27,5	1,53648	0,943594
33	P23142	Fibulina-1	FBLN1	18,9	1,78562	0,89996
34	P04083	Anexina A1	ANXA1	1,7	3,22915	0,871199
35	P60660	polipéptido ligero de miosina 6	MYL6	6,1	1,34471	0,868408
36	Q8NBS9	proteína 5 que contiene el	TXNDC5	12,7	1,44452	0,840255

No proteína	Identificación (UniProtKB)	Nombre de la Proteína	Símbolo del gen	Cubrimiento de secuencia	Valor -Log p	Log ₂ CCC/sano (≥1.5)
		dominio de tioredoxina				
37	P01903	Antígeno de histocompatibilidad clase II cadena alfa DR	HLA-DRA	12,7	1,8618	0,837038
38	IGK	Cadena ligera kappa de la inmunoglobulina	IGKLC	13,1	1,45256	0,836902
39	P60983	Factor de maduración de la glía	GMFB	13,5	1,79827	0,835114
40	Q9P2E9	Proteína 1 de unión al ribosoma	RRBP1	7,2	1,42062	0,829178
41	CLU	Clusterina	CLU	40,2	1,46453	0,80384
42	P60709	Actina, citoplasmática 1	ACTB	95,5	2,44854	0,796907
43	Q14697	Glucosidasa AB-alfa neutral	GANAB	73,6	1,34113	0,794298
44	Q5T440	Transferasa putativa CAF17, mitocondrial	IBA57	62,3	1,82991	0,786381
45	O15145	Proteína relacionada con la actina -ARP 2/3	ARPC3	12,7	1,8414	0,783625
46	P20700	Laminina-B1	LMNB1	25,9	2,11904	0,771775
47	P29401	Transcetolasa	TKT	26,5	1,83611	0,768851
48	P09936	Ubiquitina carboxilo terminal hidrolasa L1	UCHL1	13,3	1,87	0,762224
49	P23284	Peptidil-prolil cis-trans isomerasa B	PPIB	76,8	2,44242	0,76075
50	IGHV5-51	Immunoglobulin cadena pesada región variable 5	IGHV5-51	28,6	1,34353	0,760024
51	P46821	Proteína 1B asociada a microtubulos	MAP1B	8,1	1,93918	0,753317
52	P08758	Anexina A5	ANXA5	32,1	2,24649	0,748289
53	Q16643	Debrina	DBN1	23,3	3,15496	0,736964

No proteína	Identificación (UniProtKB)	Nombre de la Proteína	Símbolo del gen	Cubrimiento de secuencia	Valor -Log p	Log ₂ CCC/sano (≥1.5)
54	DPYSL3	Proteína 3 relacionada a dihidropirimidina	DPYSL3	67,3	2,62163	0,72132
55	P19105	Miosina cadena ligera 12A	MYL12A	15,7	1,98328	0,721148
56	IGHM	Inmunoglobulina M cadena pesada	IGHM	15,3	2,78983	0,720956
57	Q08431	Lactadherina	MFGE8	57,3	1,68684	0,718256
58	TAGLN2	Transgelina-2	TAGLN2	4,8	3,50579	0,715121
59	P21926	CD9 antígeno	CD9	13,1	1,76135	0,701469
60	IGHV3	Inmunoglobulina cadena pesada region variable 3	IGHV3-72	14,8	1,45697	0,6944
61	Q01518	Proteína 1 asociada adenilato ciclasa	CAP1	42,3	1,80429	0,690451
62	P60903	Proteína S100-A10	S100A10	49,9	1,8454	0,689905
63	VCAN	Versican	VCAN	50,5	1,30631	0,685074
64	P00450	Ceruloplasmina	CP	60,4	1,4977	0,678948
65	IGA2	Inmunoglobulina	IG	44,9	1,41562	0,667264
66	P67936	Tropomiosina alfa-4	TPM4	55,6	1,49832	0,665826
67	O75368	Proteína rica en ácido glutámico dominio unión a SH3	SH3BGRL	20,2	2,00505	0,65166
68	P07437	Tubulina	TUBB	34,3	2,26067	0,640143
69	P06703	Proteína S100-A6	S100A6	7,9	1,43998	0,635877
70	O14579	Coatomero subunidad epsilon	COPE	23,3	1,37726	0,634171
71	Q99879	Histona H2B type 1-M	HIST1H2BM	48,9	1,5786	0,633923
72	SNX6	Nexina de clasificación 6	SNX6	26,8	1,66438	0,62618
73	Q96QV6	Histona H2A tipo 1-A	HIST1H2AA	62,9	1,55045	0,625205
74	P06702	Proteína S100-A9	S100A9	7,5	1,41424	0,615475

No proteína	Identificación (UniProtKB)	Nombre de la Proteína	Símbolo del gen	Cubrimiento de secuencia	Valor -Log p	Log ₂ CCC/sano (≥1.5)
75	IGHG2	Inmunoglobulina gama gamma region 2	IGHG2	7,5	1,38464	0,607244
76	IGKV3D-11	Inmunoglobulina kappa Region V-III	IGKV3D-11	63,1	3,12392	0,604235
77	TPM3	Tropomiosina alfa-	TPM3	16,4	1,80801	0,597761
78	P62805	Histona H4	HIST1H4 A	61,2	1,34366	0,590955

Tabla 9.

Proteínas reguladas a la baja significativamente en la comparación CCC vs sano.

No proteína	Identificación (UniProtKB)	Nombre de la proteína	Símbolo Gen	Cubrimiento de secuencia	-Log p value	Log ₂ CCC/sano (≤0.67)
1	O75112-2	Proteína 3 de unión al dominio LIM	LDB3	43,5	2,20713	-1,63515
2	O75112-4	Proteína 3 de unión al dominio LIM	LDB3	65,1	1,92669	-1,40825
3	Q92552	Proteína ribosomal 28S mitocondrial S27	MRPS27	42,1	1,98734	-1,23556
4	Q8WZ42-2	Titina	TTN	71,2	1,46328	-0,973165
5	Q14192	Proteína 2 de cuatro dominios y medio LIM	FHL2	70,5	1,70823	-0,927023
6	P06732	Creatin kinasa tipo M	CKM	85,1	2,07545	-0,852195
7	P13929	Beta-enolasa	ENO3	55,4	2,11477	-0,83692
8	P48735	Isocitrato dehidrogenasa, mitocondrial	IDH2	25,8	2,17043	-0,82347
9	Q7Z4H3-3	Proteína 2 contiene dominio HD	HDHC2	29,5	2,124	-0,81527

No proteína	Identificación (UniProtKB)	Nombre de la proteína	Símbolo Gen	Cubrimiento de secuencia	-Log p value	Log ₂ CCC/sano (≤ 0.67)
10	P24310	Citocromo oxidase subunidad 7A1, mitocondrial	C COX7A1	39	1,64998	-0,792674
11	Q15651-2	Proteína contiene un dominio de unión a nucleosomas de alta movilidad	3 un HMGN3	72,7	2,01593	-0,738907
12	P53814-2	Esmotelina	SMTN	88,8	1,39053	-0,735022
13	P00403	Citocromo oxidasa subunidad 2	C MT-CO2	59,4	2,0759	-0,707526
14	P09104-2	Gamma-enolasa	ENO2	59,3	2,33497	-0,689774
15	P15259	Phosphoglycerato mutasa 2	PGAM2	19,7	1,86316	-0,684525
16	Q1RMZ4	Acetil-coenzima A sintetasa 2-like, mitocondrial	ACSS1	31,6	1,72032	-0,676215
17	P41222	Prostaglandina-H2 D-isomerasa	PTGDS	64,1	1,50346	-0,636401
18	P23434	Sistema de escisión de glicina mitocondrial	GCSH	35	1,98286	-0,61877

El **Análisis ontológico (GO)**: A partir de las 96 proteínas expresadas diferencialmente (PED) entre el grupo CCC vs sano, y usando la herramienta g: profile tool, se realizó un análisis de clasificación por ontología génica (*Del inglés Gen Ontology GO*) (Figura 19).

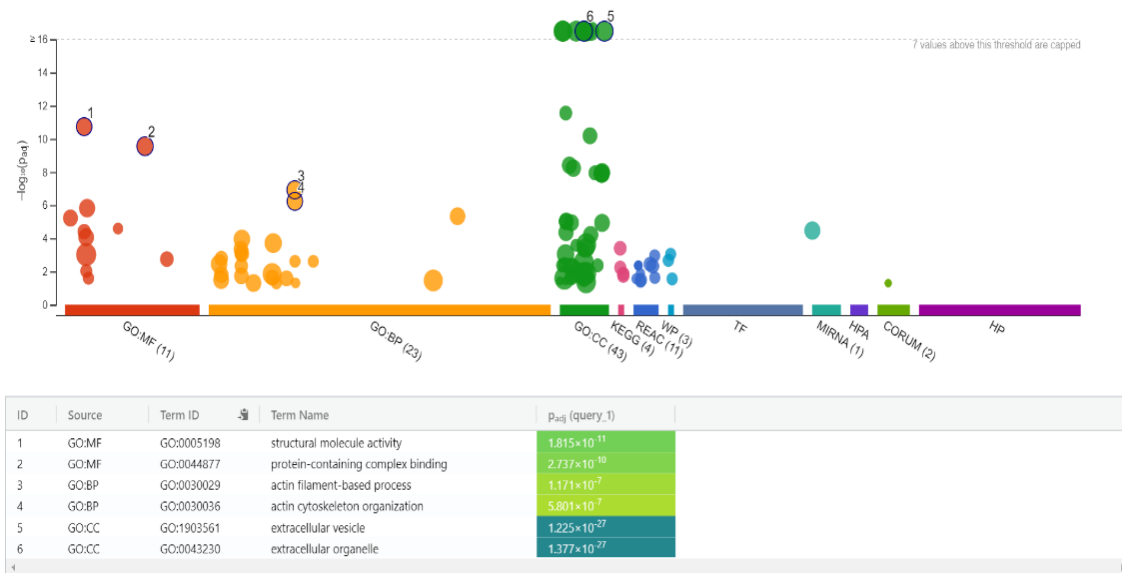
El **análisis de función molecular (MF)** evidenció que las PED en esta comparación participaron en: moléculas con actividades estructurales (p ajustada=1.815e-11), complejos de unión que contienen proteínas (p ajustada= 2.737e-10), proteínas de unión al citoesqueleto (p

ajustada= 1.496 e-6), constituyentes estructurales de la matriz extracelular (p ajustada= 2.541 e-5) (Figura 19) (Apéndice C).

El **análisis de procesos biológicos (BP)** mostró que las proteínas del grupo CCC estuvieron involucradas en procesos basados en los filamentos de actina (p ajustada=1.171e-7), organización supramolecular de la fibra (p ajustada=4.570e-6), organización del citoesqueleto (p ajustada= 1.105e-4), transporte mediado por vesículas (p ajustada=1.909e-4) y procesos del sistema inmune (fagocitosis, activación del complemento, vía clásica, respuesta inmune humoral (p ajustada= 4.473e-4, 8.226e-4, 1.604e-3 respectivamente). Por otra parte, el análisis del **componente celular (CC)** encontró que la mayoría de las proteínas se localizaron en varios compartimentos tales como: vesículas extracelulares (p ajustada= 1.225e-27), organelas extracelulares (p ajustada= 1.377e-27), exosoma extracelulares (p ajustada= 9.624e-27) y espacio extracelular (p ajustada= 6.401e-25) (Figura 19).

Figura 19.

Análisis funcional de las proteínas expresadas diferencialmente en la comparación CCC vs sano.



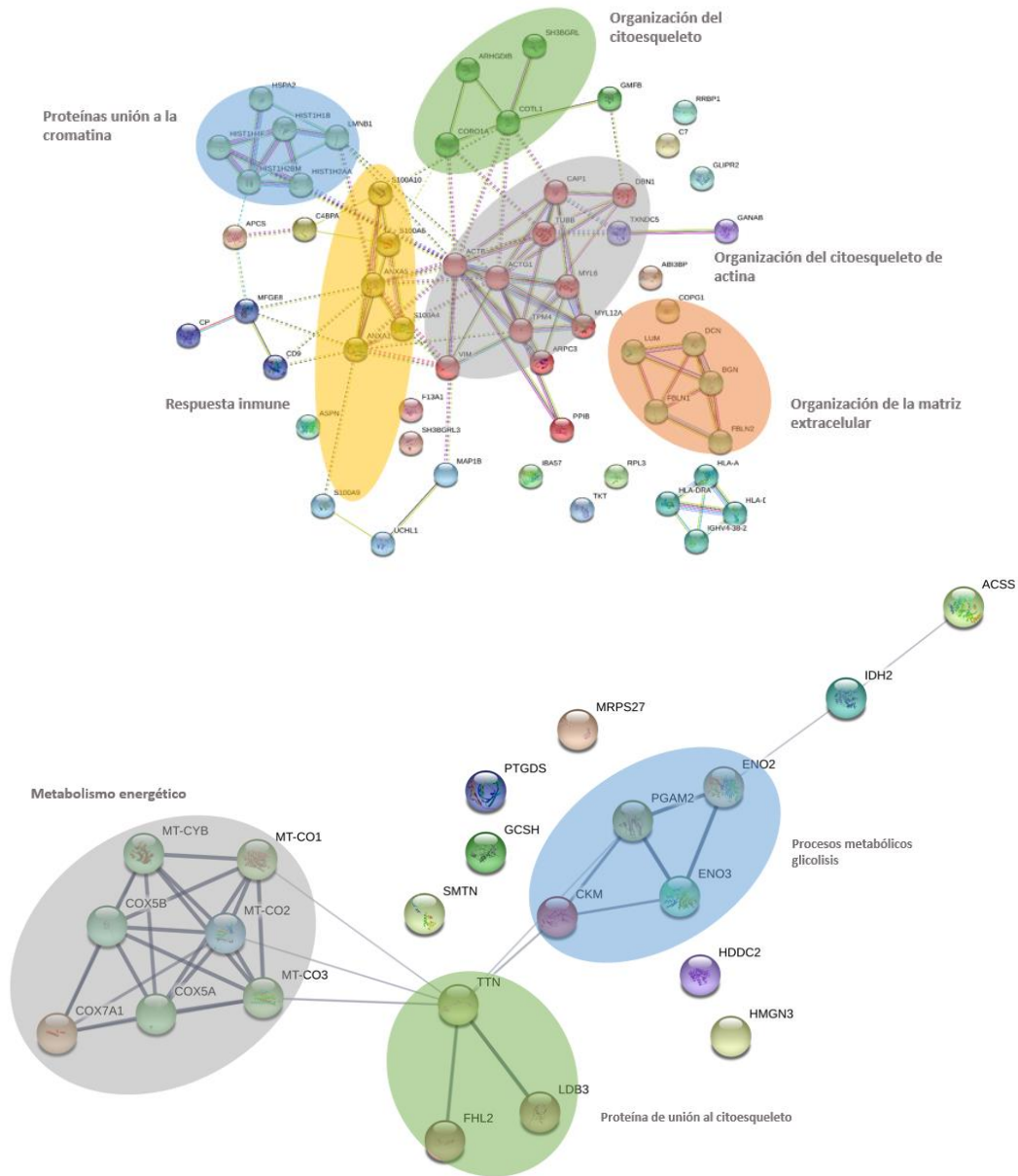
Nota. La figura muestra el análisis de ontología génica de 96 proteínas desreguladas en la comparación CCC vs sano usando la herramienta g: profiler. Las esferas de color naranja, amarillo y verde corresponden a las categorías función molecular, procesos biológicos y componente celular, respectivamente.

Para detectar posibles interacciones entre las proteínas diferenciadas en la comparación CCC vs sano, se utilizó el software STRING versión 11. Se estableció el criterio de inflación MCL (MCL=3) para agrupar las proteínas reguladas al alza como a la baja en una red interactiva. El análisis reveló que la mayoría de las proteínas desreguladas al alza presentan numerosas interacciones significativas entre ellas, tal enriquecimiento indica que las proteínas están al menos parcialmente conectadas. De acuerdo con el agrupamiento MCL, cinco nodos fueron obtenidos y cada uno de ellos es mostrado en un círculo de color diferente en la figura 20A. Los nodos más complejos de esas interacciones fueron los relacionados con organización del citoesqueleto (FDR: 0.00064), organización de la matriz extracelular (FDR: 0.00093) y proteínas de unión a la

cromatina y sistema inmune (FDR: 0.004)). Por otra parte, en el grupo de proteínas reguladas hacia la baja se detectaron procesos metabólicos asociados a la glicolisis, metabolismo energético y proteínas de unión al citoesqueleto Figura 20B. El listado detallado de los procesos biológicos significativos en los que están involucrados estas proteínas se muestra en la tabla suplementaria 2.

Figura 20.

Análisis mediante STRING, de la conexión funcional entre las proteínas desreguladas al en el grupo CCC con respecto al control sano, identificadas por espectrometría de masas.



Nota. A) La imagen presenta las proteínas expresadas diferencialmente y las conexiones entre ellas. El grupo CCC presenta sobreexpresión de las proteínas involucradas en la organización del citoesqueleto de actina, homeostasis de la matriz extracelular y respuesta inmune B) Análisis de interacción correspondiente a las proteínas reguladas a la baja. Se identificaron principalmente nodos de proteínas asociadas con metabolismo energético.

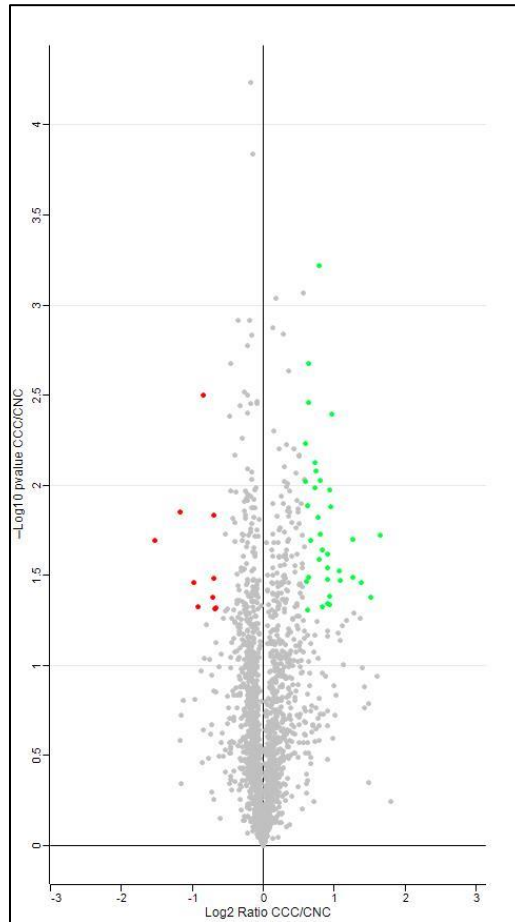
4.3.2 Análisis de expresión diferencial del proteoma de tejido cardiaco humano en la comparación CCC vs CNC

Como se comentó anteriormente, el objetivo principal de esta investigación fue la búsqueda de proteínas específicas asociadas a desarrollo de falla cardiaca durante la EC. Las proteínas implicadas en la fisiopatogenia de la FC pueden participar en diferentes mecanismos reguladores del sistema inmune, así como de importantes vías metabólicas, en este sentido, para precisar las alteraciones específicas del perfil proteómico del tejido en la CCC nosotros comparamos el perfil proteómico del tejido chagásico frente al proveniente de pacientes con CNC.

Las proteínas comúnmente desreguladas en el tejido con CCC vs CNC podrían constituir una nueva fuente de información en la búsqueda de proteínas biomarcadoras y dianas terapéuticas para prevenir el desarrollo de la falla cardiaca. Por esta razón, el primer paso en el análisis de los datos obtenidos fue quedarse con las proteínas diferencialmente desreguladas en la comparación CCC vs CNC. Este análisis identificó 45 proteínas expresadas diferencialmente de las cuales, 35 se clasificaron como sobreexpresadas en el grupo CCC en comparación con el grupo CNC, considerando un incremento en su nivel de expresión de $>1,5$ veces (*fold change* $>1,5$). Por otra parte, 10 proteínas se encontraron reguladas a la baja considerando un descenso en su nivel de expresión < 0.67 veces (*fold change* < 0.67) (Figura 21).

Figura 21.

Gráfico Volcano de proteínas expresadas diferencialmente en la comparación CCC vs CNC.



Nota. El análisis detectó 45 PED, de estas se detectaron 35 sobreexpresadas que corresponden a los puntos verdes y 10 inhibidas marcadas como puntos rojos. El eje X corresponde al fold change ($\text{Log}_2 \text{CCC/CNC}$).

Entre las proteínas identificadas como sobreexpresadas las que presentaron mayor significancia estadística fueron: Coactosina (COTL1), Proteína ligasa de la ubiquitina-3 (HUWE1), Lumican (LUM), Coronin-1A (CORO1A), Asporina (ASP) y Decorina (DCN) Tabla 10. Entre las proteínas inhibidas estuvieron: la proteína de unión al dominio (LIM), la proteína ribosomal mitocondrial subunidad pequeña (MRPS27) y la subunidad reguladora de la proteína fosfatasa 1(PPP1R12B) Tabla 10.

Tabla 10.

Proteínas sobrepresadas significativamente en la comparación CCC vs CNC.

No proteína	Identificación (UniProtKB)	Proteína	Símbolo Gen	Cubrimiento de secuencia	-Log p value	Log ₂ CCC/CNC (≥1.5)
1	Q14019	Coactosina	COTL1	48,4	1,72233	1,65687
2	Q7Z6Z7-2	Proteína ligasa de de la ubiquitina E3- HUWE1	HUWE1	15,7	1,37681	1,52318
3	P51884	Lumican	LUM	13,9	1,45914	1,38317
4	P31146	Coronina-1A	CORO1A	47,8	1,69993	1,26833
5	Q9BXN1	Asporina	ASPN	5,9	1,49208	1,26318
6	P07585	Decorina	DCN	13,8	1,47035	1,09184
7	Q10588-2	ADP-ribosil ciclasa	BST1	15,4	1,52215	1,07647
8	P63261	Actina, citoplasmática 2	ACTG1	34,2	2,3956	0,969893
9	Q9H299	Proteína 3 rica en ácido glutámico que se une al dominio SH3	SH3BGRL3	47,7	1,88366	0,954096
10	P08670	Vimentina	VIM	67,6	1,97586	0,942978
11	Q96QV6	Histona H2A type 1-A;	HIST1H2AA	33,2	1,38641	0,938534
12	P98095	Fibulina-2	FBLN2	25,3	1,34054	0,938309
13	P0DP08	Cadena pesada de la Inmunoglobulina región V-II NEWM;	IGHV4-61	43,2	1,34635	0,911217
14	P26447	Proteína S100-A4	S100A4	31,7	1,478	0,907758
15	Q5Y7A7	Antígeno de histocompatibilidad clase II HLA, DRB1-13	HLA-DRB1	46,9	1,61892	0,904289
16	P13796	Plastina-2	LCP1	54	1,54315	0,90245
17	Q9BUT1-2	3-hidroxi-butirato dehidrogenasa tipo 2	BDH2	41,3	1,63948	0,839266
18	Q8WU39	Proteína específica de las células de la zona marginal B- B1	MZB1	49,2	1,32464	0,82944
19	P60983	Factor beta de maduración glial	GMFB	48	2,02532	0,809476

No proteína	Identificación (UniProtKB)	Proteína	Símbolo Gen	Cubrimiento de secuencia	-Log p value	Log ₂ CCC/CNC (≥1.5)
20	Q99879	Histona H2B tipo 1-M	HIST1H2BM	45,2	1,73211	0,805423
21	P01871	Inmunoglobulina M cadena pesada	IGHM	47,2	3,21841	0,788863
22	O15145	Subunidad 3 del complejo de proteínas relacionadas con la actina 2/3	ARPC3	32,9	1,58952	0,783908
23	P29401	Transcetolasa	TKT	31,1	1,82437	0,767157
24	P04083	Anexina A1	ANXA1	73,3	2,08134	0,742648
25	P39023	Proteína ribosomal L3 60S	RPL3	13,6	1,98387	0,73307
26	P21926	Antígeno CD9	CD9	48,7	2,12798	0,725131
27	Q5T440	Transferasa putativa CAF17, mitocondrial	IBA57	45,7	1,69204	0,666919
28	O14579-2	Coatomero subunidad epsilon	COPE	27,6	2,46003	0,646572
29	P60709	Actina, citoplasmática 1	ACTB	11,6	2,67459	0,640377
30	P20700	Laminina-B1	LMNB1	14,9	1,48751	0,636671
31	P37802-2	Transgelina-2	TAGLN2	13,2	1,88475	0,630035
32	P51397	Proteína 1 asociada a muerte	DAP	45,6	1,30885	0,623428
33	P20671	Histona H2A tipo 1-D	HIST1H2AD	31,3	1,46563	0,612039
34	P23284	Peptidil-prolil cis-trans-isomerasa B	PPIB	15,6	2,23351	0,591955
35	P30740	Inhibidor de elastasa de leucocitos	SERPINB1	48,4	2,02037	0,588261

Tabla 11.

Proteínas disminuidas significativamente en la comparación CCC vs CNC.

No proteína	Identificación (UniProtKB)	Nombre de la proteína	Símbolo Gen	Cubrimiento de secuencia	-Log10 p value	Log ₂ CCC/CNC (≥1.5)
1	O75112-4	Proteína 3 que se une al dominio LIM	LDB3	44,9	1,69636	-1,5262
2	O75112-2	Proteína 3 que se une al dominio LIM	LDB3	49,5	1,85364	-1,1779
3	O75112-3	Proteína 3 que se une al dominio LIM	LDB3	23,2	1,46216	-0,987069
4	Q92552	Proteína 28S ribosomal mitocondrial	MRPS27	46,6	1,32494	-0,924789
5	O60237-4	La subunidad reguladora 12B de la proteína fosfatasa 1	PPP1R12B	43,2	2,50235	-0,839993
6	Q96HC4-2	proteína 5 del dominio LIM y PDZ	PDLIM5	40,5	1,37725	-0,71059
7	P52943	Proteína 2 rica en cisteína	CRIP2	13,1	1,83345	-0,692746
8	P00441	Superóxido dismutasa [Cu-Zn]	SOD1	48,3	1,4819	-0,691643
9	Q15056-2	Factor de iniciación de la traducción eucariota 4H	EIF4H	37,1	1,31549	-0,685393
10	P22234	Proteína multifuncional ADE2	PAICS	44,1	1,3187	-0,674296

El análisis funcional de las proteínas expresadas diferencialmente en la comparación CCC vs CNC mediante el algoritmo GO reveló que las proteínas estaban implicadas de manera

significativa en diferentes actividades. Por ejemplo, en el análisis **de procesos biológicos** se observó que las proteínas desreguladas participaron principalmente en procesos basados en filamento de actina (p ajustada= 3.32e-04), organización del citoesqueleto de actina (p ajustada=7.1e-04), activación celular (p ajustada= 1.41e-03) y procesos efectores inmunes (p ajustada=1.73e-03). El **análisis de función molecular** detectó que estas proteínas participan en actividades de complejo de unión (p ajustada=2.6e-03), actividad molecular estructural (p ajustada=1.30e-04), unión a la actina (p ajustada= 2.600e-3) y matriz extracelular (p ajustada= 7.88e-03). Finalmente, el análisis de **localización celular** de estas proteínas determinó que se localizaron principalmente en las vesículas extracelulares (p ajustada= 1.08e-14), organelas (p ajustada=1.14e-14), exosomas extracelulares (p ajustada=1.20e-13), filamentos de actina (p ajustada= 1.35e) y fibra supramolecular (p ajustada= 3.0e-6) (figura 22).

Figura 22.

Análisis funcional de las proteínas diferenciales en la comparación CCC vs CNC

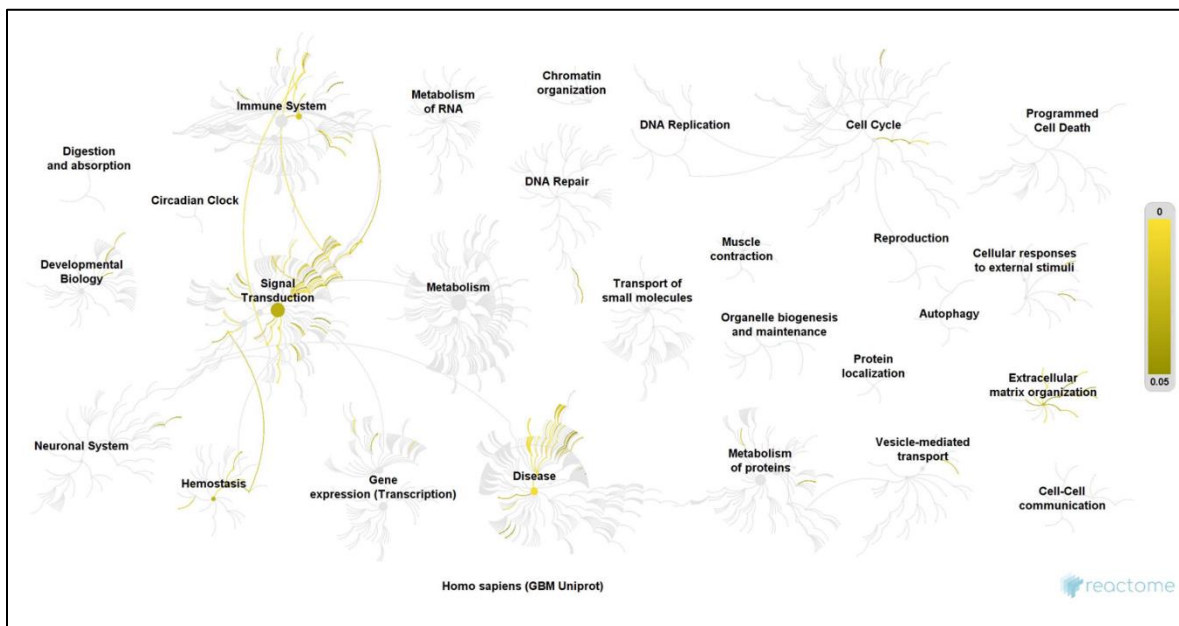


Nota. Función molecular (MF), procesos biológicos (BP) y compartimento celular (CC) con la herramienta g: profiler. La tabla muestra los procesos con más alto puntaje en cada categoría. Las proteínas en MF estuvieron involucradas en: moléculas con actividad estructural GO:0005198, complejos de unión que contienen proteínas GO:0044877.

Un análisis de sobrerrepresentación fue realizado a través de la herramienta Reactoma, el cual mediante un test estadístico determina si ciertas vías están enriquecidas. De este modo, 34 de los 38 identificadores en la muestra se encontraron en el reactoma, donde 669 vías fueron impactadas por al menos una de ellas. Las dos vías canónicas más relevantes clasificadas por valor de p fueron transducción de señales y respuesta inmune (Figura 23).

Figura 23.

Reactoma de las proteínas expresadas diferencialmente en la comparación CCC vs CNC.

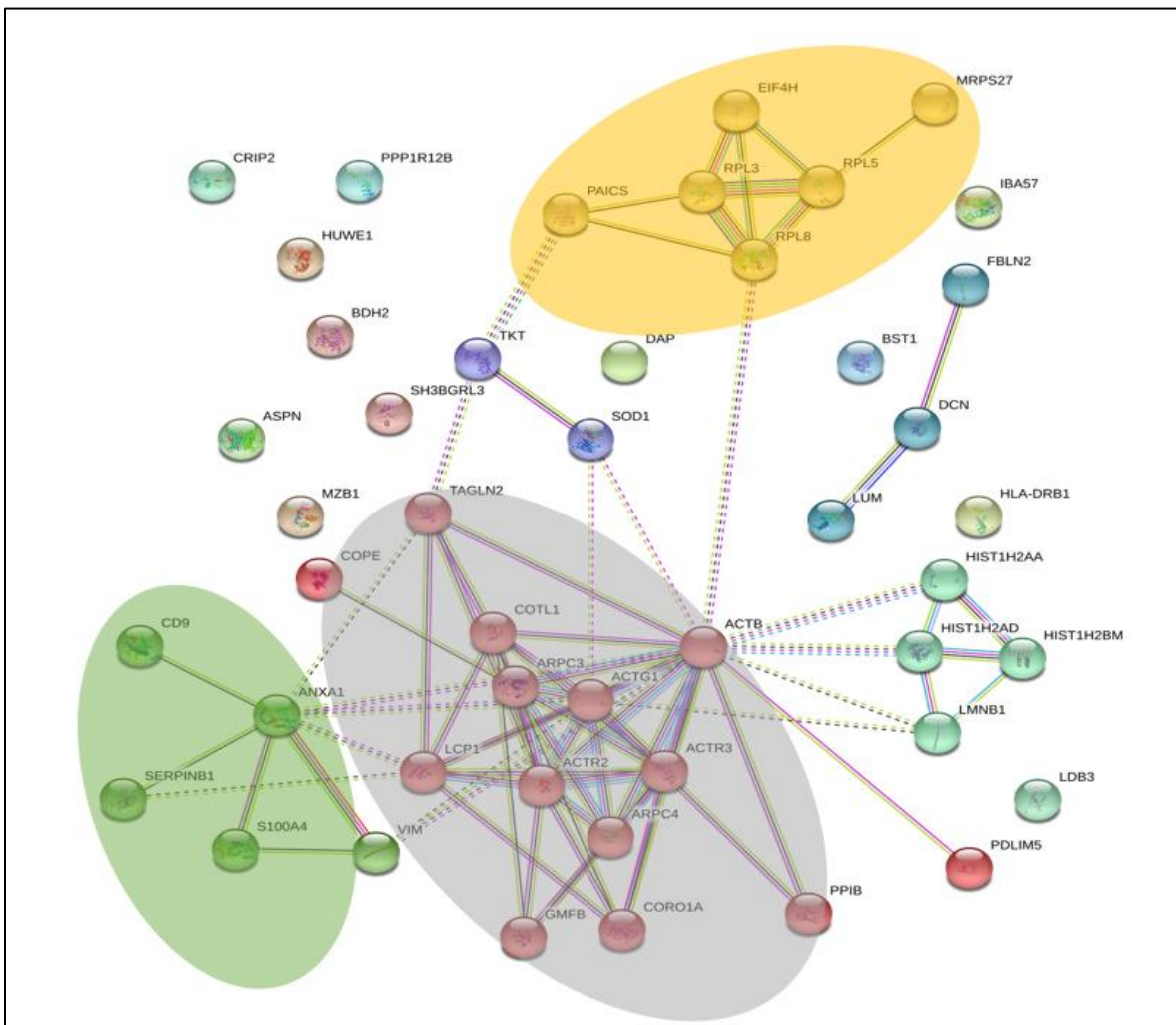


Las 45 PED en la comparación fueron utilizadas para construir la red de interacción proteína-proteína en STRING. El análisis reveló interacciones entre las proteínas detectadas, destacándose 3 nodos. El primer nodo formado por 14 proteínas (color rosado) las cuales fueron asociadas a procesos de desarrollo en el tejido y organización supramolecular de la fibra. El segundo nodo involucró proteínas asociadas a mecanismos de regulación de la traducción de

proteínas y proliferación celular (RPL3, PAICS, MRPS27 y EIF4H) y se representó en color amarillo. Finalmente, el nodo 3 conformado por ANXA1, SERPINB1, CD9, S100A4 en color verde se relacionó con procesos de regulación de la respuesta inmune (Figura 24).

Figura 24.

Red de interacción proteína- proteína usando STRING en la comparación CCC vs CNC.



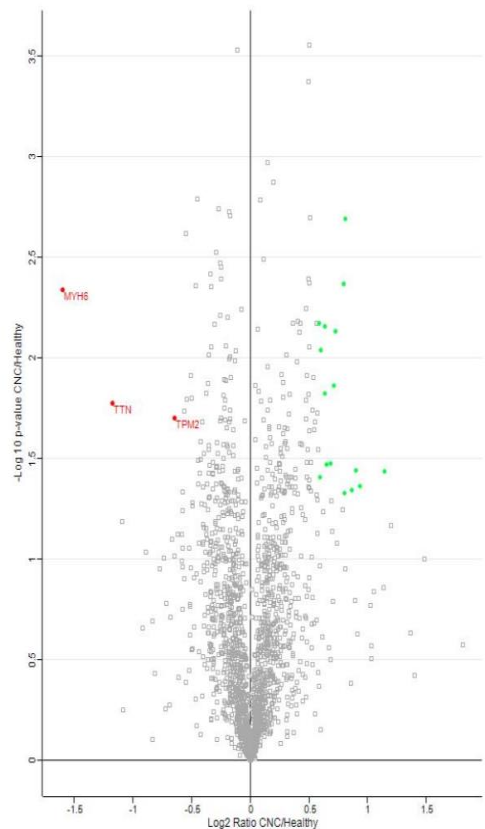
Nota. El análisis mostró interacción significativa entre las proteínas que permitió identificar tres nodos significativos. Se estableció un valor mínimo de interacción (0,150) y se utilizó el algoritmo de agrupación de Márkov para generar la estructura con un parámetro de inflación de 3.

4.3.3 Análisis de expresión diferencial del proteoma de tejido cardiaco humano en la comparación CNC vs sano.

Para identificar las proteínas con expresión diferencial en la comparación CNC frente al grupo control sano, se consideraron los siguientes criterios: umbral de ≥ 1.5 y < 0.67 y una $p < 0.05$. Este análisis permitió identificar 19 proteínas con cambios significativos (Figura 25). De estas, 17 estuvieron sobreexpresadas Tabla 12 y 3 reguladas a la baja Tabla 13.

Figura 25.

Gráfico Volcano entre la comparación CNC vs sano.



Nota. El análisis detectó 19 PED, de estas se detectaron 16 sobreexpresadas que corresponden a los puntos verdes y 3 inhibidas marcadas como puntos rojos.

Tabla 12.

Proteínas sobreexpresadas en la comparación CNC vs sano.

No proteína	Identificación proteína (Unitpro KB)	Nombre de la proteína	Símbolo Gen	-Log 10 valor p CNC_SANO	Log ₂ ratio CCC/CNC (≥1.5)
1	Q8WZ42-5	Titina	TTN	1,43855	1,14185
2	P01009	Alpha-1-antitripsina	SERPINA1	1,36491	0,935424
3	P19652	Glicoproteína alfa-1-ácida	ORM2	1,44107	0,898982
4	P01860	Inmunoglobulina cadena gamma pesada region 3	IGHG3	1,34188	0,865798
5	P0DOX8	Inmunoglobulina cadena lambda polipéptido 5	IGLL5	2,69193	0,806922
6	P0DOY2	Inmunoglobulina cadena lambda cadena constante region 2	IGCL2	1,32811	0,800133
7	P50440-3	Glicina amidinotransferasa, mitocondrial	GATM	2,36889	0,793259
8	A0A0C4DH25	Inmunoglobulina cadena kappa V-III region B6	IGKV3D-20	2,13316	0,722281
9	P02787	Serotransferrina	TF	1,8639	0,714799
10	A0A0C4DH38	Immunoglobulin cadena pesada variable 5-51	IGHV5-51	1,47643	0,682085
11	P01834	Inmunoglobulina cadena kappa	IGKC	1,47028	0,65039
12	P05155-2	Inhibidor C1 proteasa plasmática	SERPING1	2,15509	0,638222
13	P10643	Componente C7 del complemento	C7	1,82314	0,634311
14	A0A075B6K4	Inmunoglobulina cadena lambda V-IV region Bau	IGLV3-10	2,03947	0,600659
15	P30457	Antígeno de histocompatibilidad HLA class I cadena alfa	HLA-A	1,40833	0,589834

No proteína	Identificación proteína (Unitpro KB)	Nombre de la proteína	Símbolo Gen	-Log 10 valor p CNC_SANO	Log ₂ ratio CCC/CNC (≥1.5)
16	P0DP08	Inmunoglobulina cadena pesada V-II region NEWM	IGHV4-61	2,17183	0,588313

Tabla 13.

Proteínas disminuidas en la comparación CNC vs sano.

No proteína	Identificación proteína (Unitpro KB)	Nombre de la proteína	Símbolo Gen	-Log ₁₀ p-value CNC/SANO	-Log ₂ ratio CNC/SANO
1	P13533	Myosina-6	MYH6	2,3378	-1,59525
2	Q8WZ42	Titina	TTN	1,77671	-1,17351
3	P07951	Tropomiosina cadena beta	TPM2	1,70249	-0,644971

Para identificar los procesos biológicos claves de las proteínas diferenciales se realizó un análisis de enriquecimiento funcional usando la herramienta **Gene Ontology**. Como parámetro estadístico se consideró una categoría significativa a aquellas que presentaron un valor de $p \leq 0.05$ (Figura 26).

Figura 26.

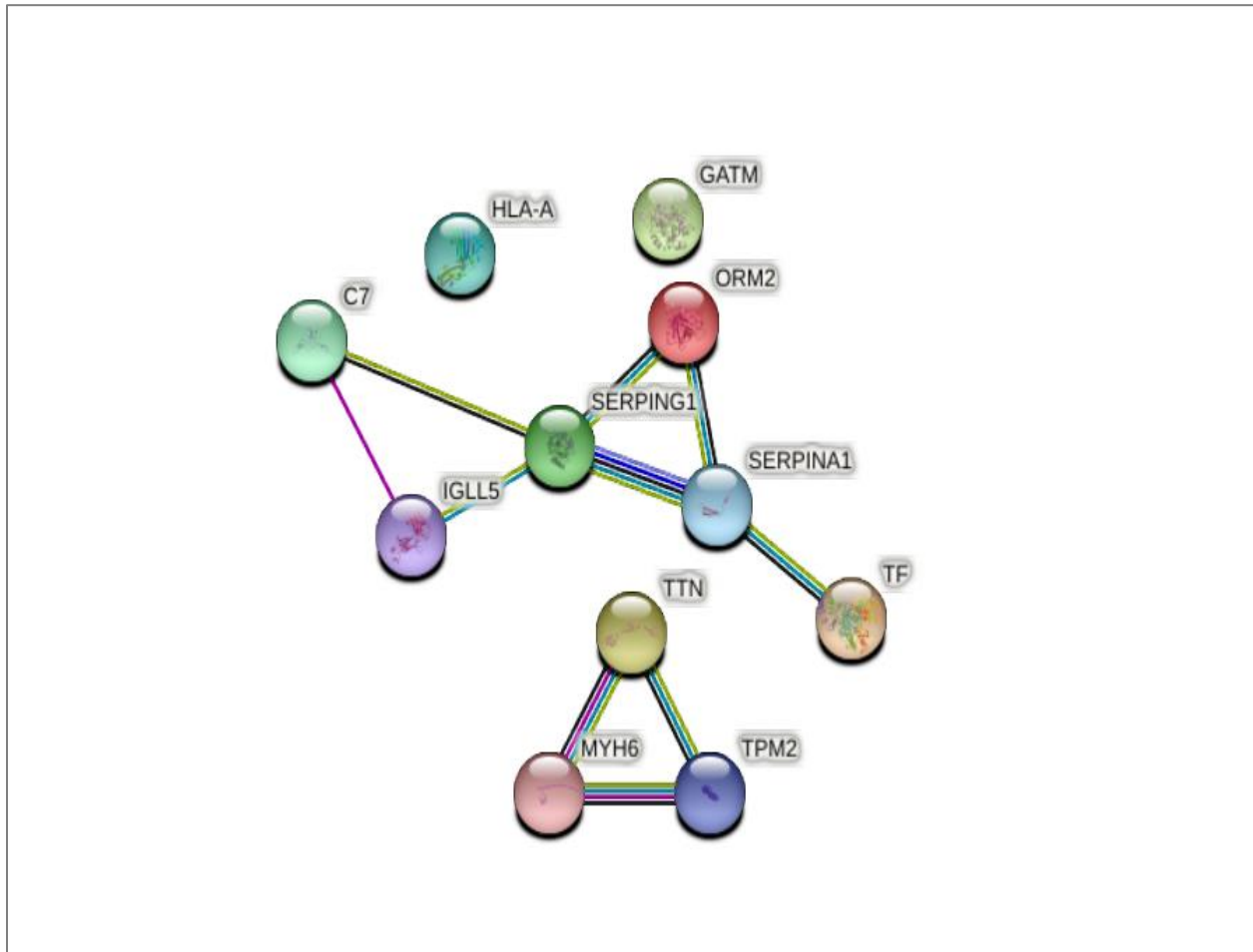
Análisis de enriquecimiento funcional GO de las proteínas diferenciales en la comparación CNC vs sano.



Se generaron 2 nodos. El nodo 1, agrupó moléculas de respuesta inflamatoria como: El inhibidor C1, el componente C7 del complemento, Alpha 1 anti-tripsina, la serotransferrina y la glicoproteína 2 alfa 1 ácido, mientras que el nodo 2 asoció proteínas relacionadas con la organización del citoesqueleto (Figura 27).

Figura 27.

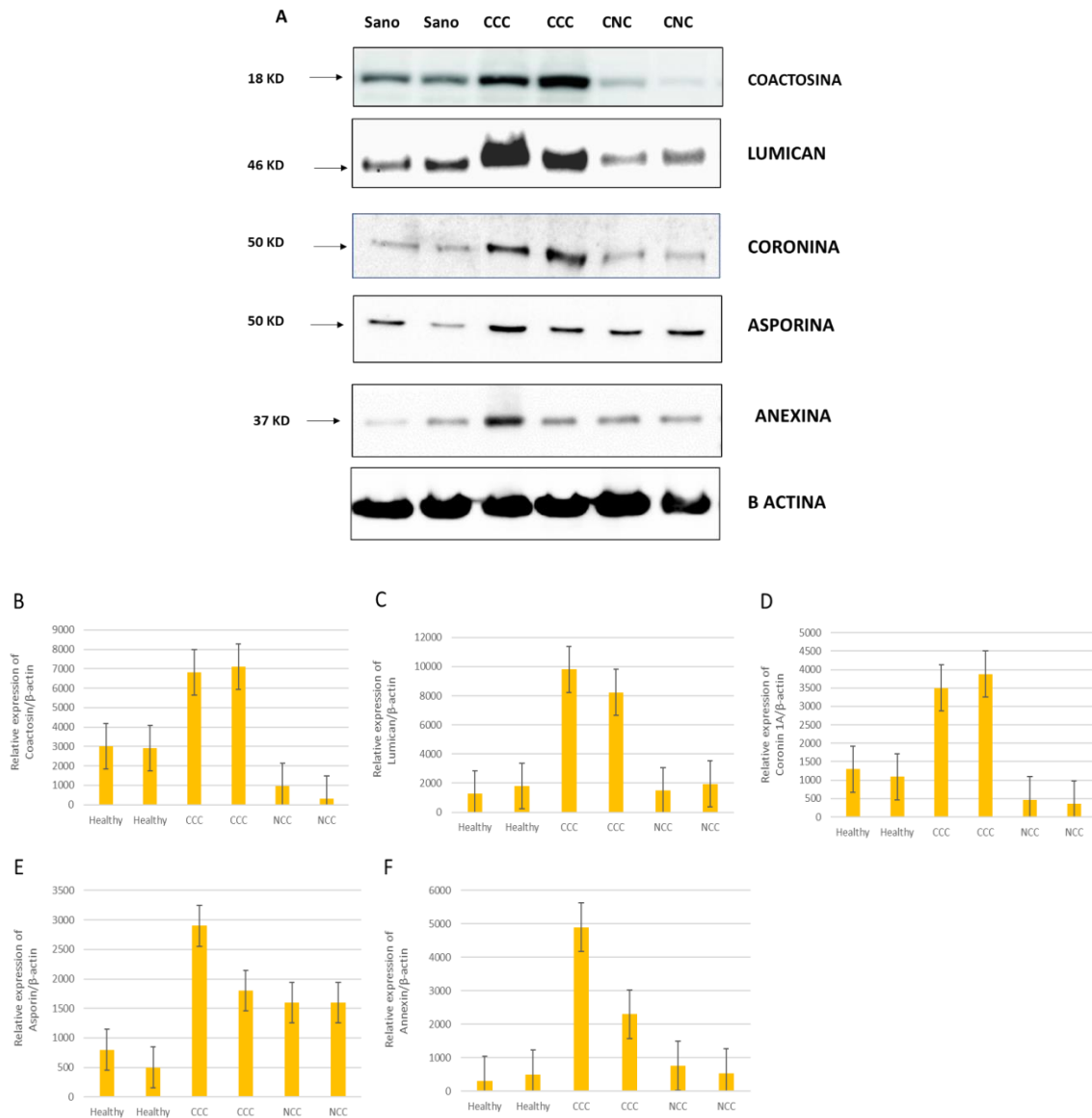
Red de interacción proteína-proteína en la comparación CNC vs sano



-Análisis de validación mediante Western Blot, de acuerdo con los resultados de la red de interacción se seleccionaron para validación por western blot las proteínas expresadas diferencialmente y que estuvieron asociadas a los nodos más significativos en la comparación CCC vs CNC. Como se muestra en la figura 28, el western blot confirmó el nivel de expresión proteica aumentado de las proteínas COTL1, CORO1A, LUM, ASPN y ANXA1.

Figura 28.

Validación por western blot de los niveles de expresión de las proteínas estadísticamente significativas.



Nota. Validación de los datos proteómicos por western blot. A) Western blot de cinco proteínas: coactosina, lumican, coronina, asporina, y anexina. β -actina es usada como control interno para normalizar la expresión. B-F) Gráfico de barras del western blot. Expresión relativa de las proteínas B) Coactosina C) Lumican D) Coronina 1 A. E) Asporina F) Anexina. Los datos son presentados como el promedio \pm la desviación estándar de tres experimentos independientes. Se muestran las barras de error.

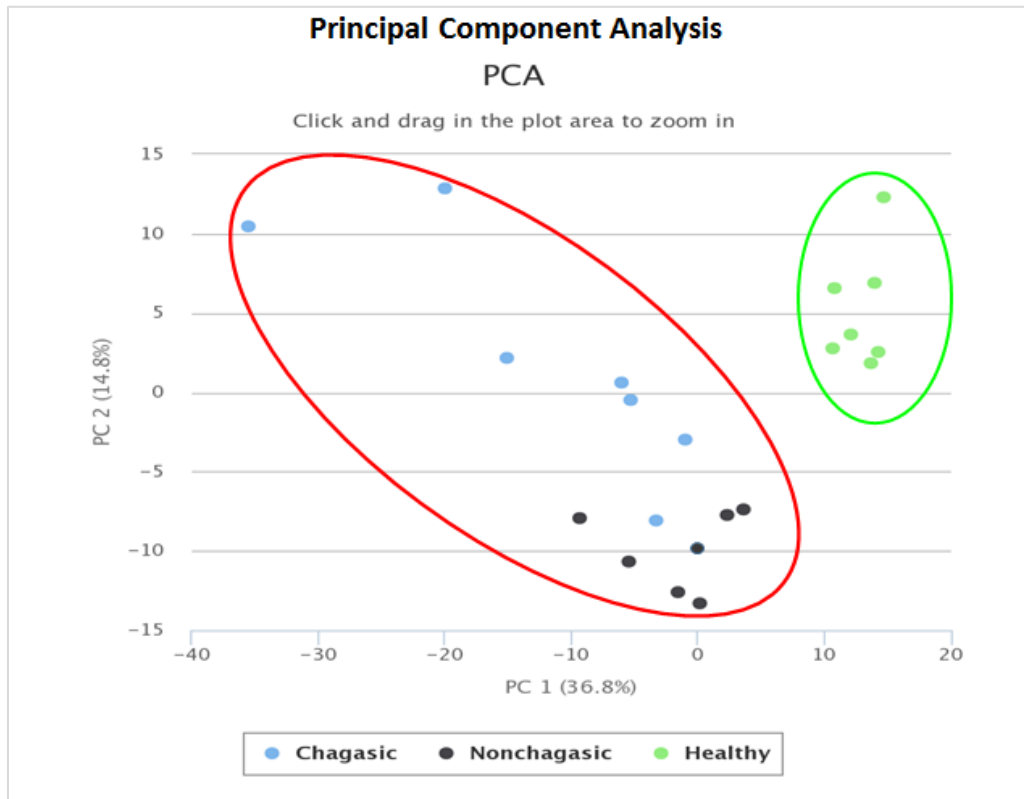
4.4 Resultados del análisis metabólico

Un total de 21 muestras correspondientes a las tres condiciones y con tres repeticiones fueron analizadas por espectrometría de masas. El análisis detectó 1710 características presentes en el conjunto de muestras, los cuales fueron reproducibles en términos de m/z y tiempo de retención. Previo al análisis estadístico de los resultados por espectrometría, se llevó a cabo la normalización y transformación de los datos. Posteriormente, se procedió a remover los metabolitos redundantes que estuvieran presentes a través de las muestras con lo cual quedaron 690 características que fueron usados para subsecuente análisis estadístico (Apéndice F).

A continuación, se realizó un análisis multivariado de componentes principales (PCA) para observar el comportamiento general de las muestras y describir las variables reduciendo la dimensionalidad de los datos. El PCA mostró una clara separación entre los grupos correspondientes a muestras de miocardio de pacientes con patología cardíaca frente a las muestras de los controles sanos. Sin embargo, este modelo no discriminó entre los grupos CCC y CNC, los cuales fueron automáticamente agrupados juntos (Figura 29). En la figura se puede observar que el componente 1 explica en mayor magnitud la varianza (PC1= 36.8%).

Figura 29.

Gráfico del análisis de componente principal que presenta los puntajes del primer y segundo componente.



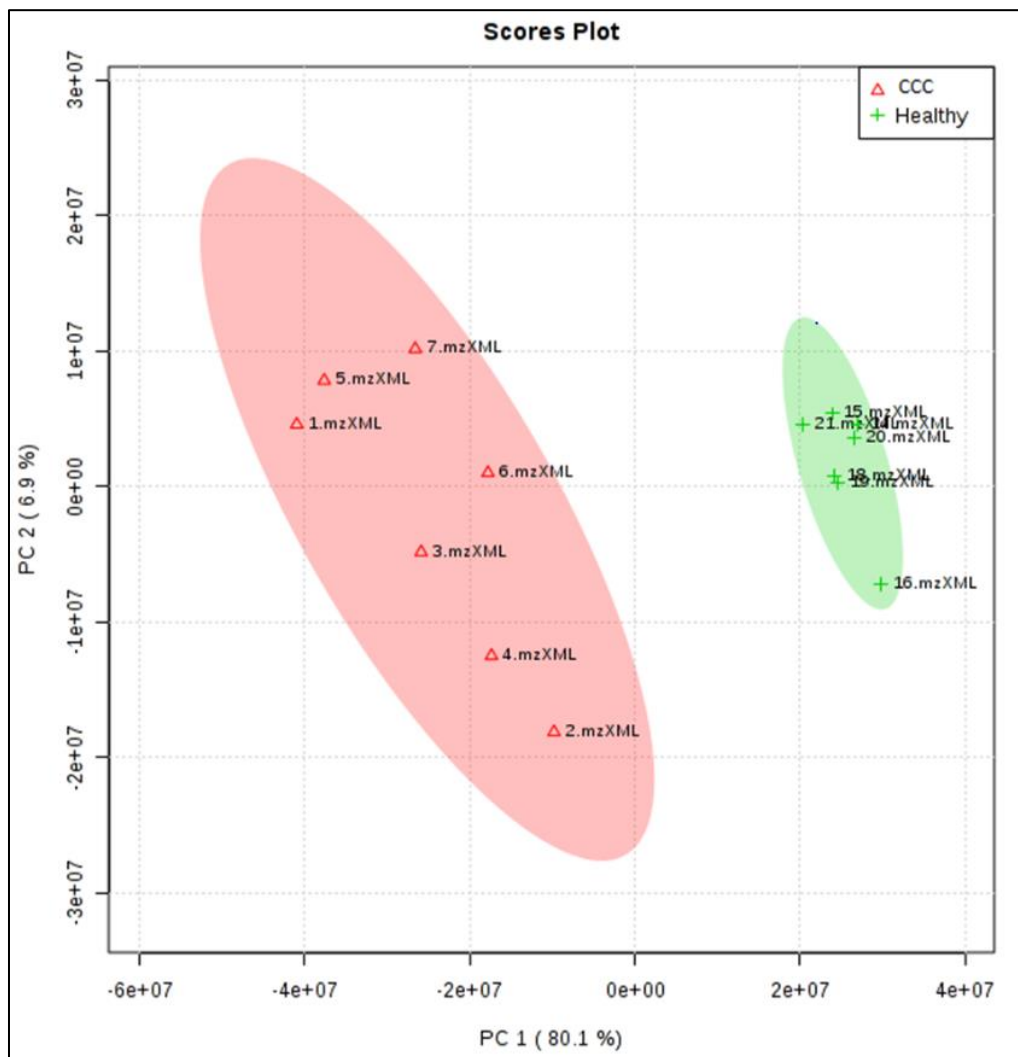
Nota. Gráfico PCA para los metabolitos detectados en los grupos con CCC, NCC y sano en modo ion positivo. La gráfica representa el puntaje de las componentes 1 y 2. Los grupos corresponden a muestras de tejido cardiaco que fueron analizadas por el sistema HPLC-MS. Los puntos en color azul corresponden a las muestras del grupo CCC ($n=7$), en negro las del grupo CNC ($n=7$) y en verde a los controles del grupo sano ($n=7$).

4.4.1 Análisis comparativo del perfil metabólico en la comparación CCC vs sano

El análisis de PCA en esta comparación evidenció una clara separación de los perfiles metabólicos, un porcentaje de la varianza total (93,41%) fue explicado por las componentes 1 y 2 (Figura 30).

Figura 30.

Gráfico de análisis de componentes principales (PCA).



Nota. La gráfica muestra los valores de la componente principal 1 y 2. El porcentaje de la varianza explicado por la componente 1 (80.1%) y por la componente 2 (6,9%). En triángulos rojos se observan las muestras del grupo CCC y en cruces verdes las muestras correspondientes al grupo sano. Las áreas sombreadas representan un intervalo de confianza del 95%.

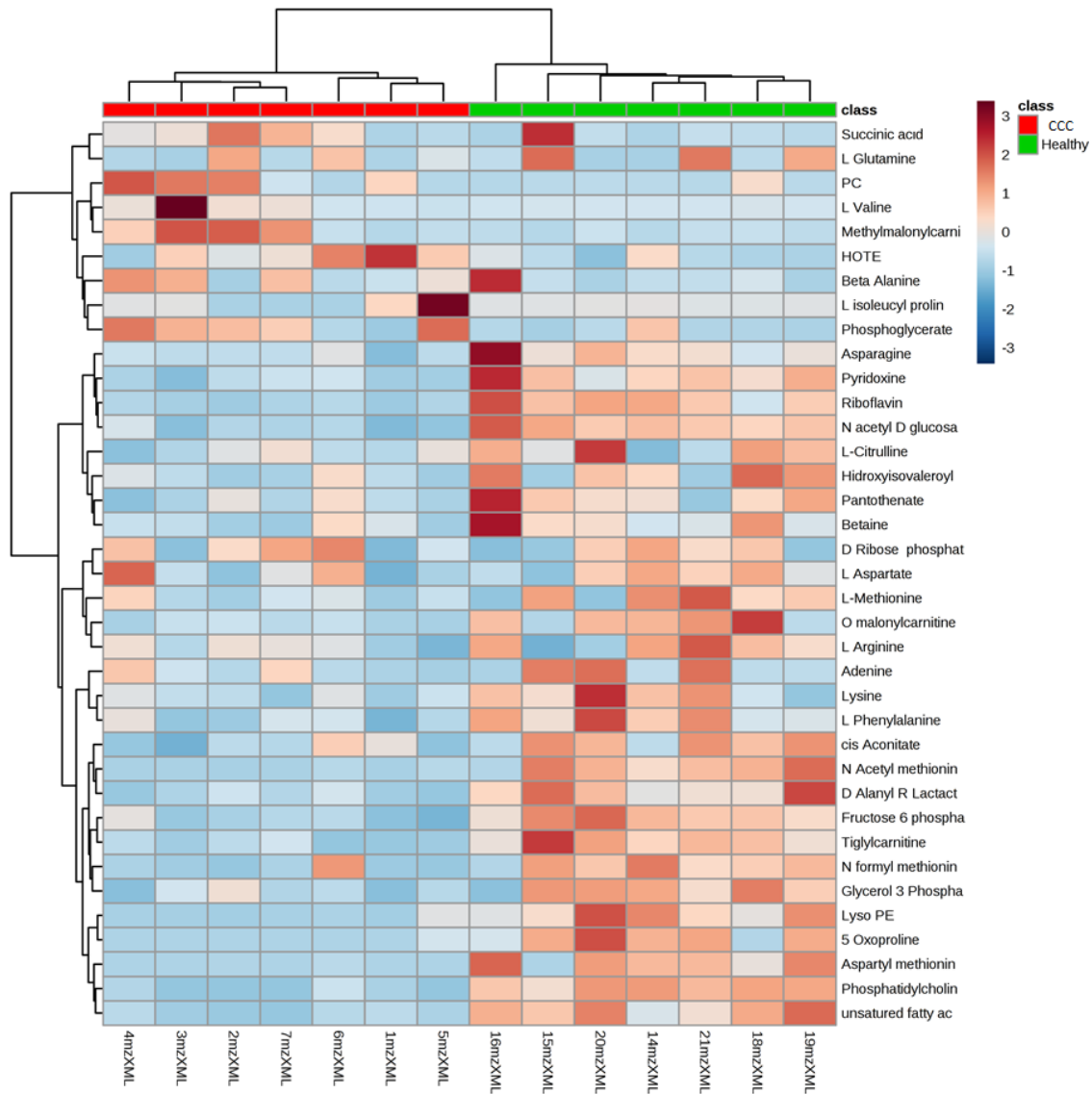
En la comparación CCC vs sano fueron identificados 40 metabolitos Tabla 14 confirmados por estándares de referencia y 222 características en los espectros de masa se detectaron como

metabolitos anotados, los cuales presentaron diferencias de manera significativa (p ajustada <0.05).

Para visualizar las variaciones en las concentraciones de los metabolitos a través de las muestras y de las condiciones experimentales, se realizó un mapa de calor en combinación con un agrupamiento jerárquico. La figura 31 muestra la representación de la abundancia de los metabolitos identificados de forma significativa entre el grupo CCC vs control sano donde es posible apreciar una disminución en la concentración de la mayoría de los metabolitos en la condición chagastica, mientras en la condición sano sus intensidades son mayores. Por otro lado, el análisis de agrupamiento jerárquico permitió la agrupación muy definida entre los grupos de estudio (Figura 31).

Figura 31.

Mapa de calor y análisis de agrupamiento jerárquico de metabolitos diferenciales entre CCC vs Control sano.



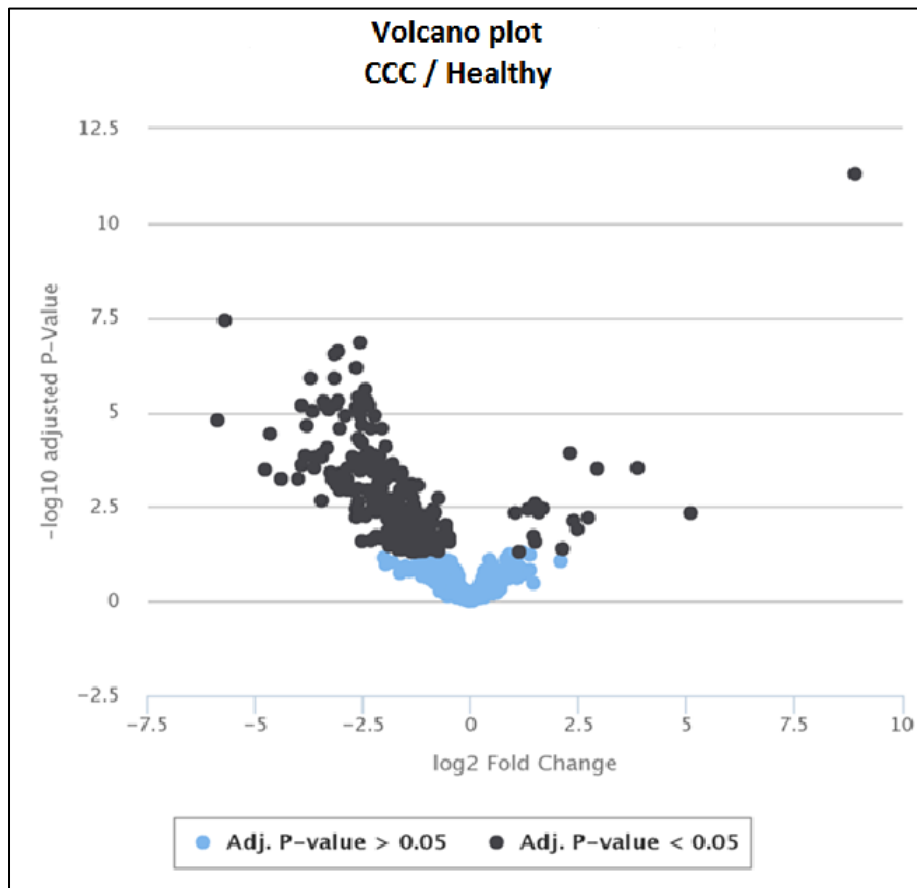
Nota. Las columnas corresponden a muestras y las filas a metabolitos individuales. La escala de color indica la abundancia relativa de metabolitos siendo rojo más abundante y azul menos abundante.

El análisis estadístico univariado *t student* permitió identificar las moléculas diferenciales con significación estadística entre los grupos ($p \leq 0.01$) basándonos en la relación masa/carga

exacta, el tiempo de retención, la distribución isotópica y la correspondencia a estándares conocidos. Posterior al procesamiento, las características fueron clasificados como anotados o identificados.

Figura 32.

Gráfico volcano de los metabolitos en la comparación CCC vs control sano.

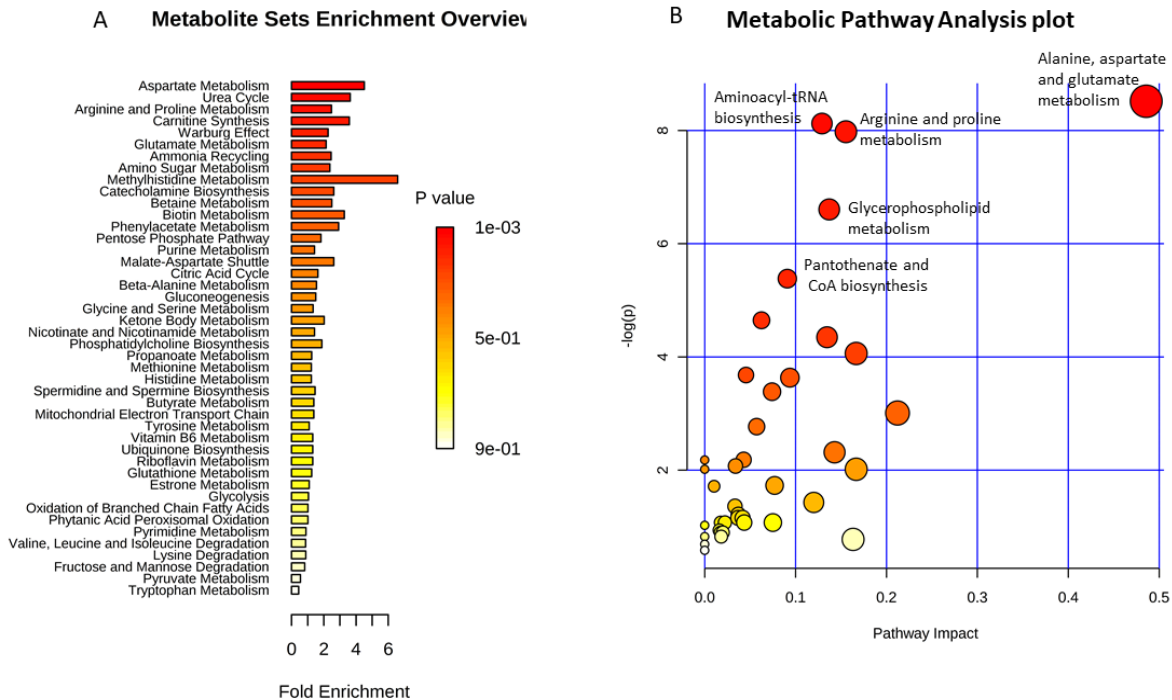


Nota. Cada punto representa un metabolito. En el eje X se grafica la magnitud del fold change y en el eje Y la significancia estadística (-log p value). Los puntos que aparecen en negro representan metabolitos significativos ($p < 0.01$), los puntos azules corresponden a los no significativos.

4.4.1.1 Análisis de vías funcional y metabólico. Un análisis de enriquecimiento del conjunto de los metabolitos diferenciales (por sus siglas en inglés MESEA) fue usado para explorar las vías moduladas diferencialmente en pacientes con CCC y grupo control sano. Esta aproximación mostró que las vías enriquecidas de manera significativa fueron el metabolismo del aspartato, ciclo de la urea, el metabolismo de la arginina y prolina, síntesis de carnitina y efecto Warburg (Figura 33A). En paralelo se generó un análisis de vías metabólicas, este análisis mostró que las vías metabólicas más impactadas fueron: el metabolismo de la alanina, aspartato y glutamato, la biosíntesis de aminoacil tRNA, el metabolismo de arginina y prolina, metabolismo del propionato, metabolismo de glicerofosfolipidos, biosíntesis del pantotenato y biosíntesis CoA, metabolismo del nitrógeno, metabolismo del ácido cianoamino, metabolismo de dicarboxilato y glioxilato, ciclo del citrato, metabolismo de metionina y cisteína y metabolismo de la β - alanina (Figura 33B).

Figura 33.

Descripción general del enriquecimiento de vías en Metaboanalyst.



Nota. A) Rutas metabólicas que presentaron mayor afectación. El análisis de enriquecimiento fue realizado con los metabolitos diferenciales y su abundancia significativa. B) Gráfico de correlación de significancia en la afectación de la ruta metabólica [Impacto en la ruta vs. $-\log(p)$] obtenidos con el módulo *Pathways Analysis* del programa MetaboAnalyst 4.0. El color de los círculos de menos a más (amarillo claro a rojo) y el tamaño (de menor a mayor) se relacionan con diferentes niveles de significancia. Un valor $-\log(p)$ alto se correlaciona con un mayor impacto en el flujo metabólico. Se seleccionaron las vías con mayor significancia a partir de los valores de impacto de la ruta o valor $p < 0.05$.

Tabla 14.

Metabolitos detectados significativamente entre los grupos CCC vs sano.

No Metabolito	ID pico	Nombre del metabolito	Log2 Fold Change CCC/ Healthy	m/z (exp)	Tiempo de retención (min)	Clase química	Valor P	Valor de P ajustado
1	128	N-Acetil Metionina	-4.75	192.0688	422.47	C7H13NO3S	0.0001	0.0004
2	559	Aspartil Metionina	-4.37	263.07	475.91	C9H16N2O5S	0.000	0.0001
3	29	PC (15:0/0:0)	-3.85	504.307	240.79	C23H48NO7P	0.000	0.0001
4	436	Liso PE (16:0/0:0)	-3.68	452.279	250.58	C21H44NO7P	0.000	0.0001
5	465	L-Noradrenalina	-3.53	170.081	464.47	C8H11NO3	0.000	0.0001
6	12	L isoleucil prolina	-3.39	229.1542	561.53	C11H20N2O3	0.000	0.0001
7	68	O-malonil L-carnitina	-3.08	248.1122	695.43	C10H17NO6	0.000	0.0000
8	277	Riboflavina	-3.0	377.1445	486.78	C17H20N4O6	0.000	0.0000
9	34	5-Oxoprolina	-2.88	130.0498	785.71	C5H7NO3	0.000	0.0000
10	213	N Formil Metionina	-2.87	178.0531	496.84	C6H11NO3S	0.000	0.0000
11	45	Adenina	-2.50	136.0617	546.22	C5H5N5	0.004	0.0128
12	92	Pirbuterol	-2.36	241.1541	590.07	C12H20N2O3	0.000	0.0000
13	192	N-acetil - D glucosamina	-2.34	222.097	657.25	C8H15NO6	0.000	0.0003
14	550	Fructosa 6 fosfato	-2.12	258.0383	795.46	C6H14NO8P	0.000	0.0003
15	163	Tiglicarnitina	-2.09	244.1538	464.78	C12H21NO4	0.0001	0.0006
16	300	Piridoxina (B6)	-2.07	170.081	464.47	C8H11NO3	0.000	0.0003
17	23	PC (16:0/0:0)	-2.03	496.339	249.4	C24H50NO7P	0.000	0.0003
18	439	Acido succínico	-2.00	117.0193	797.5	C4H6O4	0.002	0.007
19	455	Lisina	-1.92	145.0983	1160.9	C6H14N2O2	0.0008	0.0033
20	69	Hidroxisovareil carnitina	-1.90	262.1643	587.18	C12H23NO5	0.002	0.0011
21	588	D-alanil R lactato	-1.81	160.0616	505.38	C6H11NO4	0.0004	0.0025
22	89	2 metilcitrato	-1.80	207.0505	1160.39	C7H10O7	0.0005	0.0021
23	388	Glicerol 3 fosfato	-1.70	171.0066	744.30	C3H9O6P	0.0001	0.0005
24	75	L- Citrulina	-1.61	136.0617	546.22	C6H13N3O3	0.0007	0.003
25	64	L-Metionina	-1.57	150.0583	644.53	C5H11NO2S	0.0001	0.0005
26	60	PC (16:1(9Z)/18:1(11Z))	-1.49	758.5677	213.42	C42H80NO8P	0.0346	0.0752
27	367	B- alanina	-1.46	88.0404	774.77	C3H7NO2	0.0011	0.0043
28	633	cis- aconitato	-1.43	173.0092	736.89	C6H6O6	0.0114	0.0334
29	360	L- Glutamina	-1.43	145.0619	784.69	C5H10N2O3	0.0154	0.0375
30	21	D-Valina	-1.36	118.0862	632.6	C5H11NO2	0.0001	0.0008
31	18	Betaina	-1.36	118.0862	630.34	C5H11NO2	0.0003	0.0015
32	96	Asparagina	-1.31	133.0605	797.42	C4H8N2O3	0.0013	0.0048
33	52	L-Arginina	-1.30	175.110	1249.8	C6H14N4O2	0.0006	0.0025

No Metabolito	ID pico	Nombre del metabolito	Log2 Fold Change CCC/ Healthy	m/z (exp)	Tiempo de retención (min)	Clase química	Valor P	Valor de P ajustado
34	35	L-fenilalanina	-1.19	166.0861	581.32	C9H11NO2	0.0022	0.0075
35	73	4 - aminobutanoato	1.04	104.0705	796.8	C4H9NO2	0.0004	0.0019
36	471	D Ribosa 5 fosfato	1.13	229.0119	799.22	C5H11O8P	0.0003 2	0.0022
37	395	L Aspartato	1.83	132.0303	783.88	C4H7NO4	0.0031	0.0098
38	218	2 fosfo D glicerato	1.36	187.000	847.47	C3H7O7P	0.0073	0.0201
39	496	Metil-malonil carnitina	2.49	260.114	686.2	C11H19NO6	0.0023	0.0078
40	39	Acido tranexamico	8.94	158.1173	804.32	C8H15NO2	0.0000	0.0000

4.4.2 Análisis comparativo del perfil metabolómico en la comparación CCC vs CNC

Para evaluar los metabolitos involucrados con las condiciones patológicas de los grupos CCC vs CNC se realizó un PCA con dos modificaciones estadísticas. La primera correspondió a un ajuste en la desviación estándar relativa (RSD) dado el grado de variabilidad biológico propio de cada tejido entre las muestras analizadas y como segunda modificación se removió el grupo control sano. Finalmente, con estos nuevos ajustes se realizó de nuevo un PCA el cual mostró diferencias claras entre los grupos mencionados (Figura 34). Así mismo, con estos datos se realizó un análisis de volcano plot (Figura 35) donde se pudieron detectar 12 metabolitos diferenciales de forma significativa entre los grupos, 9 metabolitos se observaron disminuidos y 2 aumentados. Los metabolitos que se observaron muy disminuidos fueron: triptofano-amida, 5 hidroxitriptófano, 1 indol 3 acetamida, 4 hidroxindol 3 acetonitrilo, 3 acetilnaftiluridina, glutaril carnitina y los restantes correspondieron a componentes putativos (metabolitos aún no identificados). Por otro lado, solo dos metabolitos se detectaron aumentados en la comparación CCC vs CNC fueron el ácido graso trihidroxioctadecenoico (9, 10,13 triHOME) y N formil-quinurerina. (Ver tabla 15).

Figura 34.

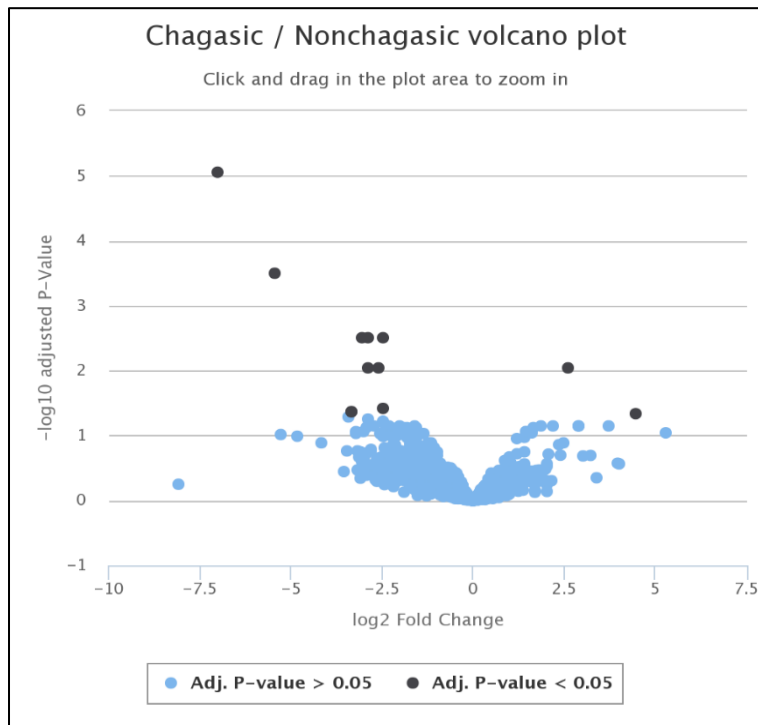
Gráfico correspondiente al análisis de componentes principales (PCA) de los datos del metaboloma del tejido cardiaco en la comparación CCC vs CNC.



Nota. Análisis de los componentes principales. Los puntos azules y negros indican las muestras provenientes del grupo CCC y CNC respectivamente. El gráfico muestra el componente 1 (PC1) en el eje de las ordenadas y PC2 en el eje de las abscisas. El porcentaje de los componentes principales primero y segundo (PC1 vs PC2) corresponde a 40,3% y los diferentes grupos discriminados por cada componente (PC1, PC2) se destacan mediante elipses de color rojo y verde.

Figura 35.

Volcano plot en la comparación CCC vs CNC.



Nota: Gráfico volcano entre CCC vs CNC. La imagen presenta en el eje X el Log2 (Fold change) y en el eje Y el Log10 transformado del valor de p de los metabolitos identificados. Cada punto indica un metabolito como valor mz/rt . Los metabolitos expresados significativamente en la comparación son mostrados como puntos negros. Al lado derecho de la figura los sobreexpresados, mientras los regulados a la baja se observan al lado izquierdo.

Tabla 15.

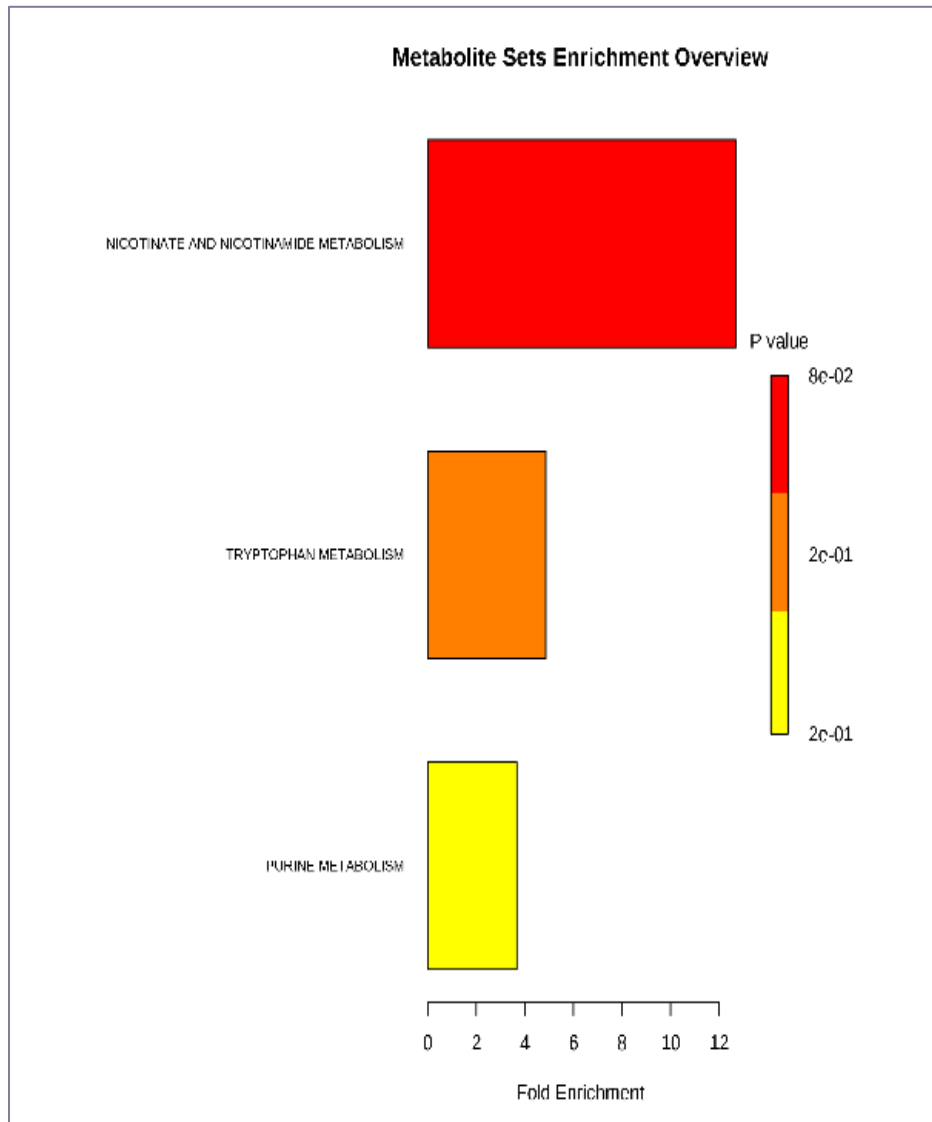
Lista de los metabolitos expresados diferencialmente entre CCC vs CNC.

No metabolito	ID Pico	Nombre del Metabolito	m/z	Tiempo de retención (min)	Clase química	Log2 CCC/CNC	Valor p	Valor de p ajustada
1	1103	9,12,13-triHOME	331.2473	225.76	C18H34O5	2.61	2.7e-05	0.0091
2	592	5-hidroxi triptofano	262.1181	352.6	C13H15N3O3	-3.34	0.00018	0.043
3	939	5-hidroxi triptofano	262.1181	302.3	C11H12N2O3	-2.59	2.6e-05	0.0091
4	885	Indol-3-acetamida	216.113	279	C10H10N2O	-2.89	2.9e-05	0.0091
5	347	Triptofanoamida	204.1131	330.31	C11H13N3O	-5.44	2.5e-07	0.00032
6	826	4-hidroxi-1h-indol-3-acetonitrilo	214.0973	308.67	C10H8N2O	-2.90	6.2e-06	0.0031
7	2299	2-ácido metilglutarico	145.0506	530.78	C6H10O4	-2.48	5.6e-06	0.0031
8	645	D-ácido glucónico	219.0471	756.5	C6H12O7	-3.06	5.8e-06	0.0031
9	968	Glutaril-carnitina	276.1435	657.96	C12H21NO6	-2.47	0.00014	0.038
10	233	l-Triptofanoamida	204.1131	290.07	C11H13N3O	-7.02	3.5e-09	8.8e-06
11	366	Formil quinurerina	259.1107	264.8	C9H15NO3S	4.47	0.0002	0.0046
12	254	NAD+	664.1148	720.87	C21H27N7O14P2	-3.45	0.0073	0.01727

Para investigar el potencial biológico asociado a los metabolitos identificados, se realizó un análisis de enriquecimiento de vías (Figura 36). Este análisis mostró que estos metabolitos participan en algunas vías importantes como la síntesis de triacilgliceroles, la lanzadera malato aspartato, glicerol fosfato, sin embargo, las vías metabólicas más impactadas de manera significativa fueron el metabolismo de la nicotinamida ($p=0,008$) y la que tiene que ver con el metabolismo del triptófano ($p=0.0217$).

Figura 36.

Análisis enriquecimiento de vías de los metabolitos diferenciales en la comparación CCC vs CNC.



4.5 Resultados del análisis de integración

Esta investigación tiene como fin encontrar alteraciones que puedan estar asociadas a los mecanismos fisiopatológicos de la falla cardiaca durante la CCC. Dada la naturaleza compleja y

heterogénea del síndrome de falla cardiaca y la fisiopatología de la CCC, esta no sería delineada por una sola ómica, sino por la integración de los resultados proteómicos y metabolómicos.

Para el análisis y la integración de los resultados proteómicos y metabolómicos se utilizó el software Ingenuity Pathways Analysis (IPA).

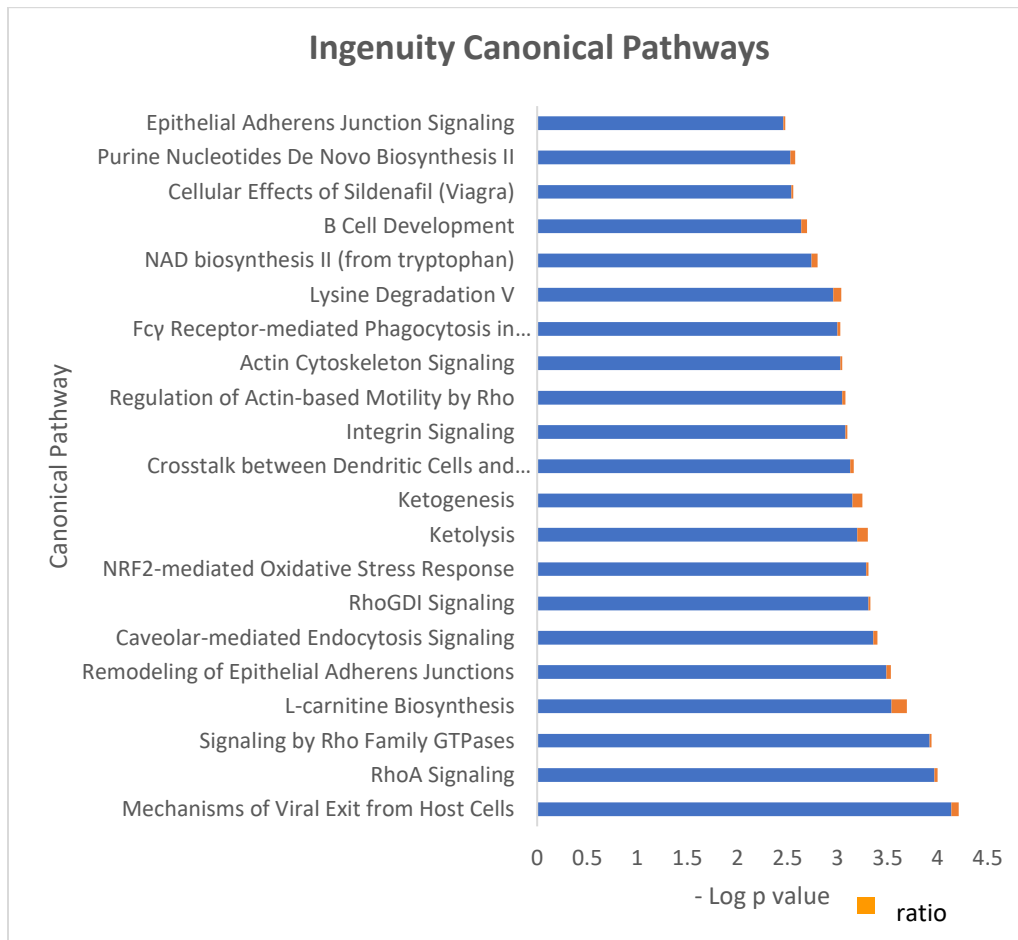
4.6 Integración de los datos en la comparación CCC vs CNC

4.6.1 Análisis integrado para la identificación de vías canónicas

El análisis de integración se basó en la lista de proteínas (45) y metabolitos (12) diferencialmente expresados en la comparación CCC vs CNC. El primer análisis estuvo dirigido a identificar las vías canónicas enriquecidas en el set de datos y estas fueron categorizadas de acuerdo con el valor de p (Figura 37). El análisis de vías a través de IPA identificó 28 vías significativas aplicando como criterio umbral $-\log(\text{valor } p) > 2.0$. Todas las vías y sus niveles relativos de expresión diferencial son listados en el Apéndice D. En la figura 37 se detallan las primeras 21 vías canónicas de las 28 representativas clasificadas de acuerdo a $-\log(\text{valor } p)$ (Apéndice D) Las cinco primeras vías canónicas con mayor valor de p fueron: mecanismos de exportación de virus de la célula hospedera ($p=7.19E-05$), vía de señalización de RhoA cinasa ($p=1.07E-04$), señalización mediante GTPasas de la familia Rho ($p=1.19E-04$), biosíntesis de L-carnitina ($p=2.91E-04$) y remodelamiento de las uniones adherentes de células epiteliales ($p=3.26E-04$).

Figura 37.

Histograma de vías canónicas afectadas en la comparación CCC vs CNC.



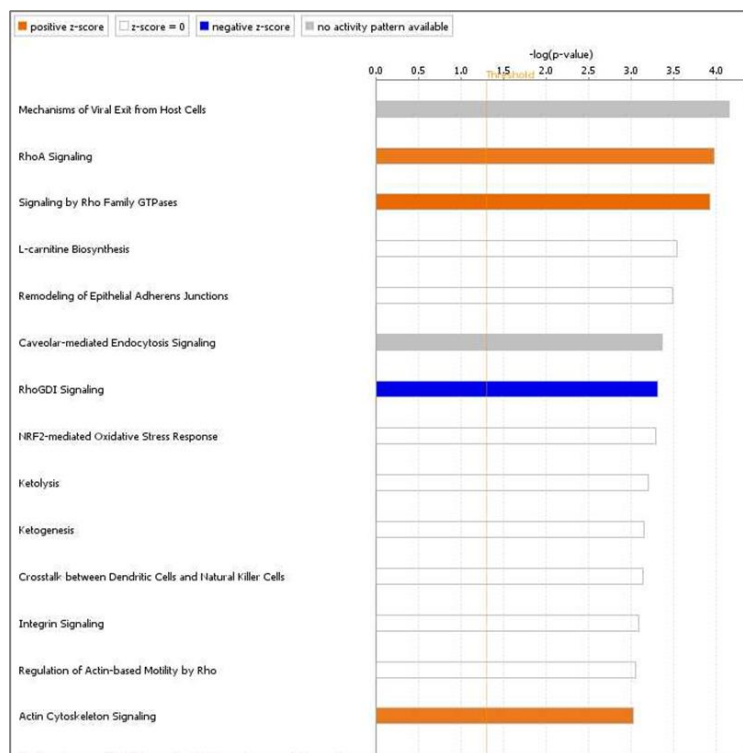
Nota. En el eje X se representa con el color azul el $-\log$ (valor p) y el ratio (CCC/CNC) con el color naranja. En el eje Y las primeras 21 vías canónicas identificadas de forma significativa a partir de un análisis de vías integrado de proteínas y metabolitos expresados diferencialmente en la comparación CCC vs CNC.

Por otra parte, el software IPA calcula para cada función biológica un puntaje estadístico denominado “Valor de activación Z” (Valor Z). El valor Z, es usado para inferir el estado probable de activación de las funciones biológicas (aumentada o disminuida) y se basa en la comparación con un modelo, el cual permite asignarle direccionalidad a la vía. Considerando en el análisis de vías un valor Z mayor o igual a 2.0 para activación significativa o menor de 2.0 para un estatus

inhibido, únicamente, se detectaron 4 vías con estatus aumentado o inhibido; y de estas tres se observaron estar activadas y una inhibida (Figura 38). Las siguientes vías presentaron alto puntaje que indicó su importancia funcional en la CCC: señalización mediante GTPasas de la familia Rho (valor $Z= 2.23$), señalización mediante RhoA (valor $Z=2.0$), señalización mediante RhoGDI (valor $Z=-2.0$) y señalización en el citoesqueleto a través de actina (valor $Z= 2.0$).

Figura 38.

Estado de activación de las vías canónicas significativas con puntaje Z.



Nota. El valor Z representa el estado de activación o inhibición de una vía canónica. Un valor de Z mayor de 2.0 fue considerado significativamente activado. Un puntaje menor a 2.0 fue considerado significativamente inhibido. Los puntajes de Z son representados por los colores naranja, azul y gris, los cuales indican activación, disminución o ausencia de la actividad de la vía canónica respectivamente. Las vías de señalización activadas son las vías dependientes de GTPasas de la familia Rho, RhoA y señalización en el citoesqueleto mediante la actina.

Adicionalmente, se generó un mapa que muestra la superposición de las vías canónicas. Este análisis se basó en el número de genes o metabolitos (candidatos identificados) que están siendo compartidos entre las diferentes vías canónicas. El análisis de superposición de vías fue realizado a partir de las 25 primeras vías canónicas detectadas como significativas y el análisis generó dos únicas redes. La primera involucró 18 vías mientras la segunda únicamente 7 (Figura 39). El número de genes compartidos para las primeras 5 vías canónicas se muestra en la Tabla 16.

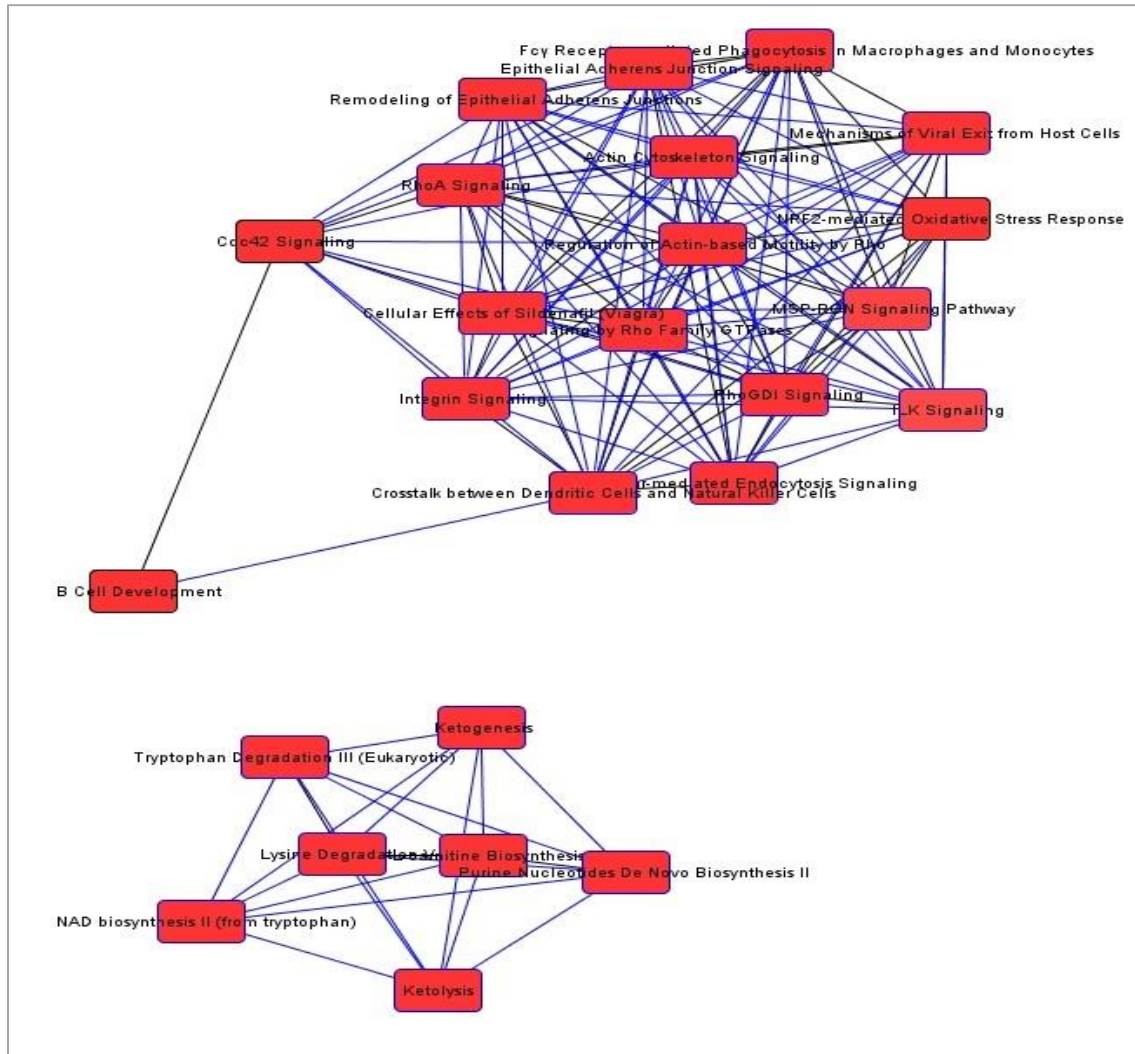
Tabla 16.

Vías moleculares y número total de genes compartidos en cada vía.

Vía canónica	Número de genes compartidos/número total de genes asociados a la vía	Porcentaje de superposición
Mecanismos de salida de la célula hospedadora	3 /41	7.3
Señalización mediante RhoA	4/125	3.2
Señalización mediante GTPasas de la familia Rho	5/246	2.0
Biosíntesis de la L-carnitina	2/13	15.4
Remodelamiento de las uniones adherentes de las células epiteliales	3/68	4.4

Figura 39.

Representación de la superposición de las vías canónicas.



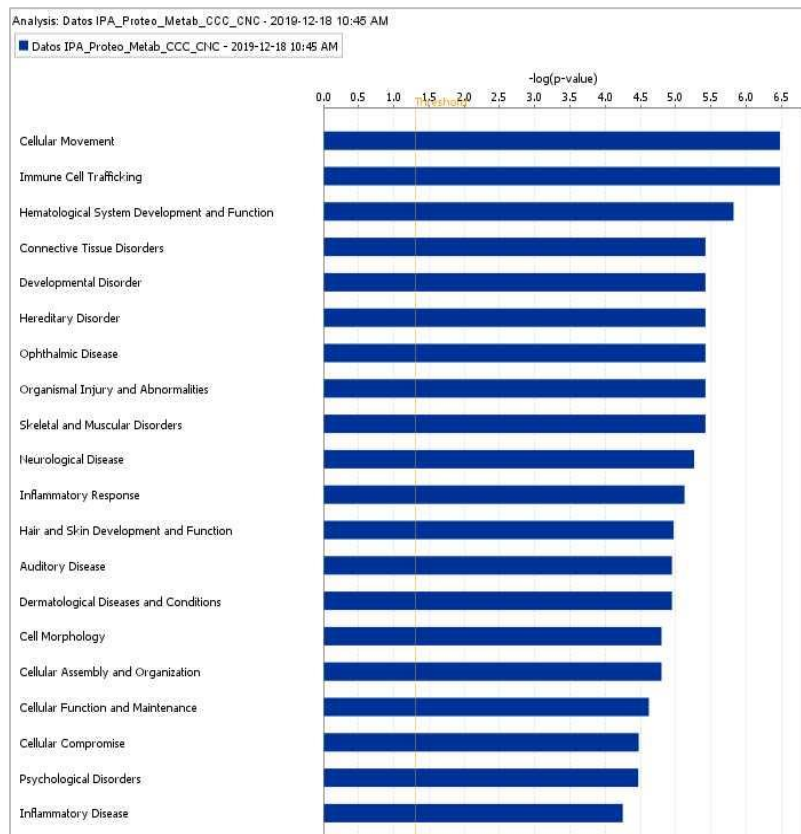
Nota. Las líneas que conectan a las diferentes vías canónicas significan que entre esas vías se comparte uno o más genes. La intensidad del color rojo del nodo representa la mayor significancia de la vía canónica entre todos los genes y metabolitos. Los nodos de la figura representan cada una de las vías y el color rojo brillante representa vías canónicas más importantes en el conjunto de genes. El mapa de vías canónicas fue generado por el software análisis de vías de Ingenuity de QIAGEN (QIAGEN Inc., <https://www.qiagenbioinformatics.com/products/ingenuity-pathway-analysis>).

4.6.2 *Análisis integrado para la identificación de las funciones biológicas y enfermedades “Biofunciones”*

Para determinar si los genes expresados diferencialmente en la comparación CCC vs CNC cumplen un papel en funciones biológicas o en enfermedades, se realizó un análisis en el software IPA, aplicando como *threshold* $-\log(\text{valor } p) > 1.30$. La figura 40, muestra las diferentes funciones y enfermedades mejor categorizadas de acuerdo con el $-\log$ del valor p . Las primeras cinco biofunciones corresponden a: movimiento celular ($p=3.31E-07-7.93E-03$), tráfico de células inmunes ($p=3.31E-07-7.83E-03$), desarrollo y función del sistema hematológico ($p=1.51E-06-7.83E-03$), desórdenes del tejido conectivo ($p=3.78E-06-7.83E-03$) y desórdenes en el desarrollo ($p=3.78E-06-7.93E-03$). La lista completa comprende 81 funciones y enfermedades y puede ser observada en la Tabla suplementaria (Apéndice E) junto con las moléculas involucradas en cada una de ellas.

Figura 40.

Clasificación en funciones biológicas y enfermedades.



Nota. Un total de 20 categorías correspondientes ya sea a una función biológica o enfermedad son graficadas en el eje Y. Por su parte, en el eje X se relaciona el valor correspondiente a $-\log$ (valor P). El threshold establecido fue > 1.30

4.6.2.1 Identificación de las funciones moleculares y celulares en el set de datos proteómicos y metabolómicos diferenciales. Las principales funciones moleculares y celulares para proteínas y metabolitos diferenciales en la comparación CCC vs CNC se caracterizaron por ser similares y se asociaron con movimiento celular, morfología celular, ensamble y organización celular, entre otras. En la **Tabla 17** se relacionan las cinco funciones biológicas detectadas con mayor significancia en la comparación.

Tabla 17.

Funciones celulares y moleculares detectadas en la comparación CCC vs CNC.

Función Celular y molecular	Rango del valor de p	No moléculas
Movimiento celular	7.93E-03 - 3.31E-07	23
Morfología celular	7.83E-03 - 1.59E-05	21
Ensamble y organización celular	8.38E-03 - 2.40E-05	19
Función y mantenimiento celular	8.38E-03 - 2.40E-05	22
Compromiso celular	7.83E-03 - 3.35E-05	17

4.6.2.2 Identificación de funciones y desarrollo del sistema fisiológico en el conjunto de datos proteómicos y metabolómicos diferenciales. El análisis de funciones asociadas al desarrollo del sistema fisiológico en IPA, detectó funciones con alto grado de significancia estadística. En la **Tabla 18** se relacionan las funciones, el rango del valor de p y el número de moléculas involucradas en cada función. Según su valor de p, las principales funciones detectadas fueron: tráfico de células inmunes, función y desarrollo del sistema hematológico, del cabello y piel, y del tejido conectivo.

Tabla 18.

Funciones asociadas al desarrollo del sistema fisiológico detectadas en la comparación CCC vs CNC.

Función y desarrollo del sistema fisiológico	Rango del valor de p	No moléculas
Tráfico de células inmunes	7.83E-03 - 3.31E-07	15
Función y desarrollo del sistema hematológico	7.83E-03 - 1.51E-06	19
Función y desarrollo del cabello y piel	6.37E-03 – 1.07E-05	7
Morfología del tejido	7.83E-03 – 6.60E-05	21
Función y desarrollo del tejido conectivo	7.83E-03 – 7.48E-05	12

4.6.2.3 Identificación de enfermedades y desórdenes en el set de datos proteómico y metabolómico diferencial. Los resultados de este análisis en IPA, indican que los genes expresados diferencialmente en la comparación CCC vs CNC se asociaron de manera significativa a enfermedades y/o condiciones. En la tabla 19 se relacionan las cinco primeras enfermedades asociadas de acuerdo con la significancia, el rango del valor de P y el número de moléculas en cada categoría.

Tabla 19.

Primeras cinco enfermedades asociadas al set de datos diferenciales de la comparación CCC vs CNC.

Enfermedades y desórdenes	Rango del valor de p	No moléculas
Alteraciones del tejido conectivo	7.83E-03 - 3.78E-06	10
Alteraciones en el desarrollo	7.93E-03 – 3.78E-06	14
Desórdenes hereditarios	7.83E-03 – 3.78E-06	17
Enfermedades oftálmicas	6.02E-03 – 3.78E-06	8
Anormalidades y lesiones organismales	8.61E-03 – 3.78E-06	36

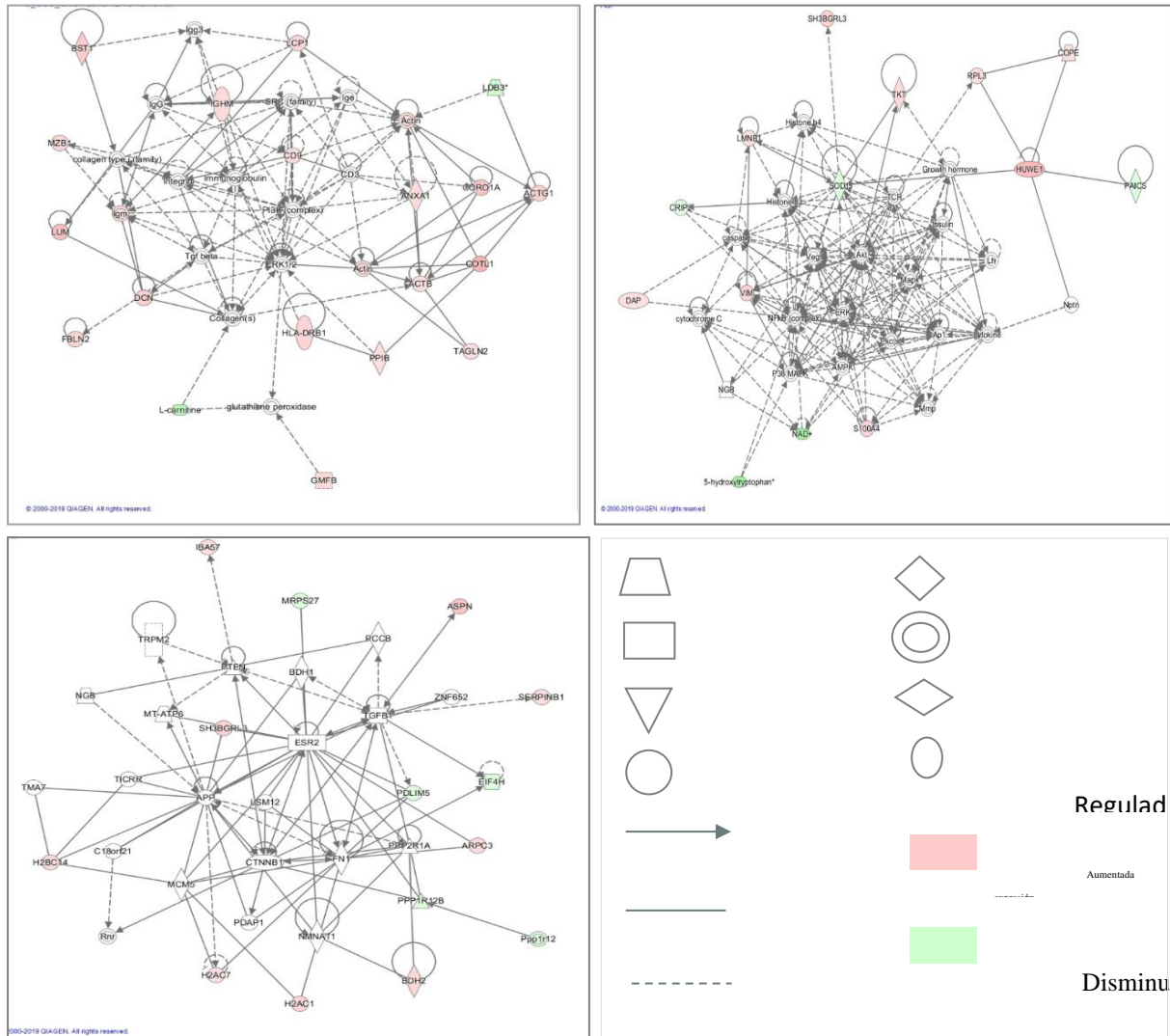
4.6.3 Análisis integrado para la identificación de redes moleculares afectadas en la comparación CCC vs CNC

El análisis de redes de interacción en IPA muestra las interacciones que ocurren entre las moléculas del set de datos. Todas las redes fueron clasificadas usando el valor del *score*. El análisis mostró que las proteínas y metabolitos candidatos se asociaron a tres diferentes redes (Figura 41). La red No 1 fue la más significativa presentó un score de 46 y estuvo enriquecida en diferentes funciones moleculares que se relacionaron con “Desarrollo y función de la piel y el cabello,

morfología celular, organización y ensamble celular” involucró 34 moléculas entre genes y metabolitos (BST1, LCP1, IGHM, SRC, FACTIN, LDB3, MZB1, Colágeno tipo I, Integrina, IgG, IgE, CD9, CD3, PI3K, ANXA1, CORO1A, ACTG1, LUM, IGM, TGFB, ERK1/2, ACTN, ACTB, COTL1, DCN, FBLN2, Colágeno, HLA-DRB1, PP1B, TAGLN2, L carnitina, glutatión peroxidasa y GMFB) (Figura 41A).

Figura 41.

Análisis de redes funcionales de proteínas y metabolitos expresados diferencialmente en la comparación CCC vs CNC. (A-C)



Nota. Redes enriquecidas basadas en los productos con expresión diferencial. En rosa se señalan los genes sobreexpresados y en verde se muestran los productos que se detectaron disminuidos de forma significativa, respectivamente. Las líneas sólidas indican conexiones directas, mientras las líneas entrecortadas conexiones indirectas.

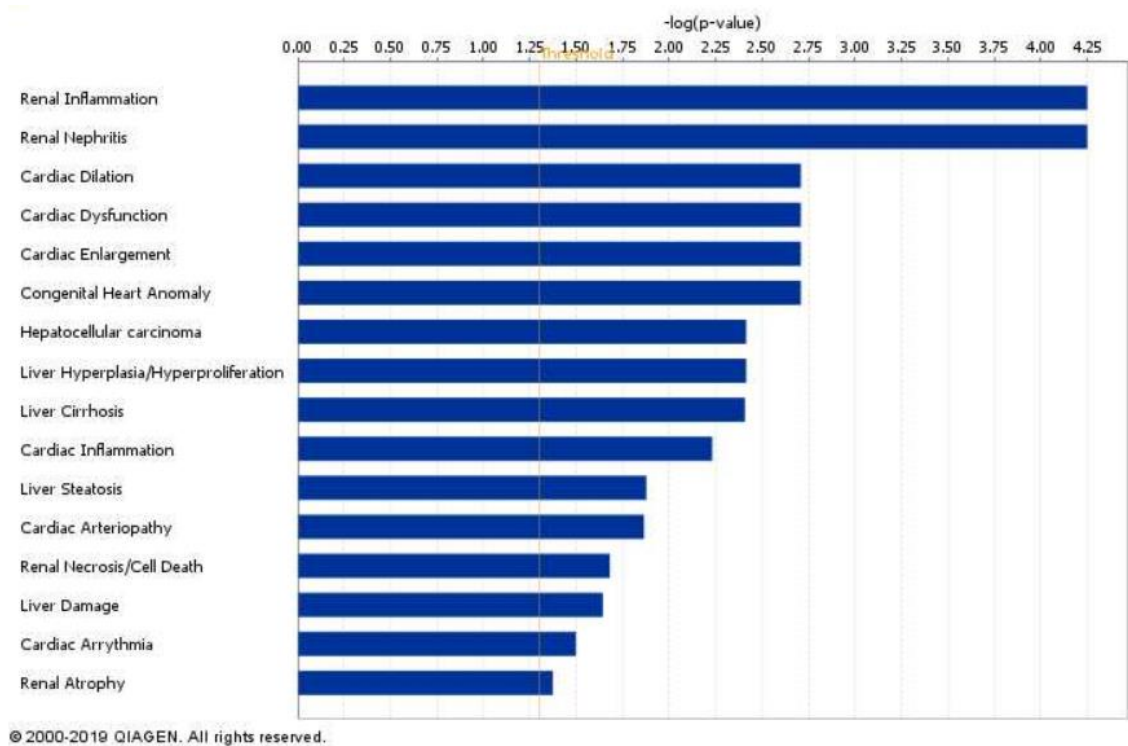
La red No 2 presentó un puntaje de 31 y las funciones asociadas a esta red fueron: morfología celular, desarrollo embrionario y desarrollo del tejido. Finalmente, la tercera red con un puntaje de 28 asoció funciones relacionadas con “Desarrollo y función del sistema cardiovascular, morfología de órganos y desarrollo organismal” (Figura 41 B y 41C).

4.6.4 Análisis integrado para identificar las funciones asociadas a toxicidad (funciones Tox)

En este análisis se determina la asociación entre proteínas y metabolitos diferenciales con efectos tóxicos. Un total de 33 funciones Tox fueron identificadas. De estas, 16 mostraron un valor de $p > 0.05$. En la figura 42 se listan las funciones asociadas a toxicidad, cabe señalar que el conjunto de datos diferencial en la comparación CCC vs CNC se relacionó de forma significativa con siete funciones de toxicidad que afectan directamente el miocardio (dilatación cardíaca, disfunción y agrandamiento cardíaco, inflamación cardíaca, anomalías cardíacas, arteriopatía cardíaca y arritmia cardíaca) de las 16 más significativas.

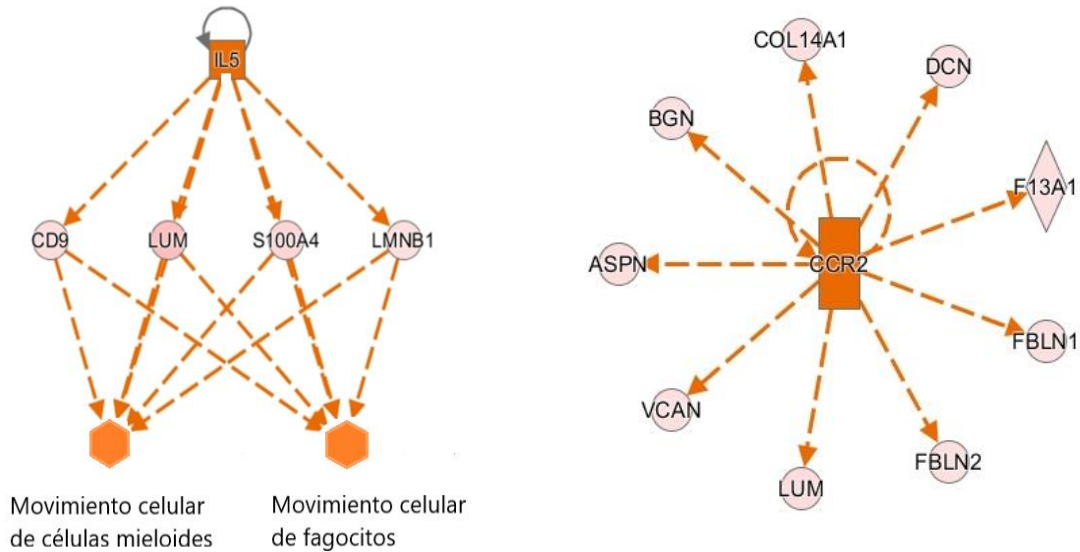
Figura 42.

Clasificación de las funciones tóxicas asociadas al conjunto de datos diferencial en la comparación CCC vs CNC



4.6.5 Análisis integrado para la identificación de reguladores efectores

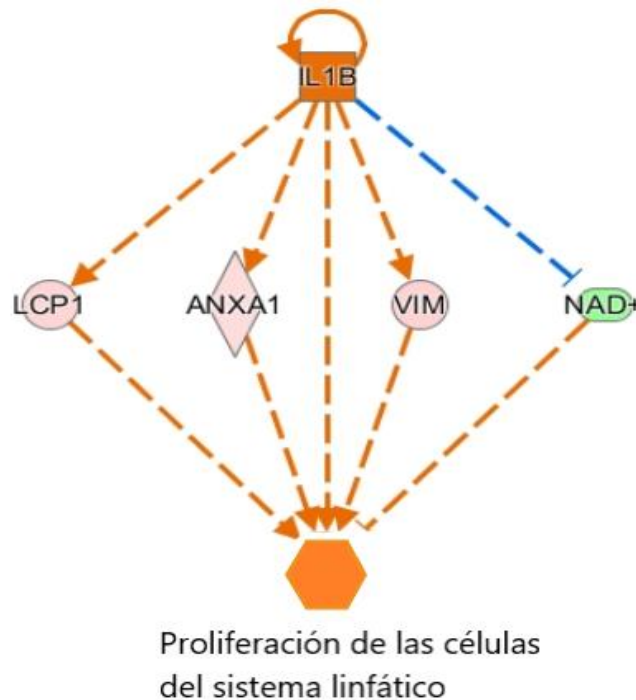
Este tipo de análisis identifica reguladores (factores de transcripción, citocinas o quinasas) que podrían estar asociados directamente a blancos presentes en los datos analizados y que podrían explicar la causa de los cambios de expresión génica, la direccionalidad del regulador o a encontrar nuevas vías basadas en los reguladores ascendentes (redes mecanicistas). En este sentido, el análisis permitió detectar algunos **reguladores** efectores como las citocinas IL-5 e IL-1 β y el receptor acoplado a la proteína G, CCR2 los cuales podrían estar actuando como activadores “corriente arriba” (Figura 43 y 44).

Figura 43.*Reguladores corrientes arriba IL-5 y CCR2.*

Nota. **A)** Interleucina 5 (IL-5) ($p=2.05 \cdot 10^{-5}$) actúa como regulador corriente arriba de los genes CD9, LUM, S100A4 y LMNB1. Se muestra la IL-5 conectada a la red mecánica (líneas de trazos) de proteínas que participan en la función biológica del movimiento celular. Esta citocina fue predicha estar activada con un puntaje de consistencia de 4.0. **B)** CCR2 ($p=7.18 \cdot 10^{-5}$) responsable de los cambios en la expresión génica de ASPN, LUM, FBLN, DCN entre otras. El *threshold* fue definido como $p < 0.005$ y $\log_2(\text{FC}) > 1.5$. El color naranja en las flechas indica activación. La forma rombo representa enzima, la forma cuadrado citocina. La grafica fue obtenida usando IPA (QUIAGEN).

Figura 44.

Red mecanística identificada usando IPA donde IL-1 β es un regulador maestro (p=0.00213).



Nota. El análisis permite inferir que IL-1 β activa el señalamiento de LCP1 (Proteína citosólica 1 de linfocitos), ANXA1 (Anexina), VIM (Vimentina) e inhibe la función de NAD (nicotinamida adenina dinucleótido).

5. Discusión

En esta Tesis Doctoral se realizó un análisis integrado del perfil proteómico y metabolómico para investigar los cambios moleculares en el miocardio de pacientes con CCC frente a pacientes con CNC. Para la discusión, se organizó el análisis en tres etapas: un primer análisis comparativo a nivel proteómico y metabolómico entre la condición CCC vs Control sano, como un acercamiento inicial para explorar los cambios globales en el corazón con falla frente al

sin falla. En segundo lugar, se realizó la comparación CCC vs CNC, la cual nos definió un perfil de las alteraciones específicas de la fase final de la FC en la condición chagásica. Finalmente, la tercera fase comprendió el análisis bioinformático *in silico* e integrado de las proteínas y metabolitos regulados de forma significativa y diferencial, en la comparación CCC vs CNC. En general, esta aproximación metodológica mostró diferencias en la abundancia de proteínas y metabolitos cuando se compararon ambos tipos de condiciones patológicas o cuando se compararon cada una frente al grupo control. En segundo lugar, las proteínas y metabolitos diferenciados estuvieron involucrados en múltiples procesos celulares. Por tanto, es esencial discutir como estas alteraciones moleculares en diferentes vías metabólicas median respuestas celulares, que actuando de manera conjunta y en determinado microambiente explican el fenotipo de la fase final de la enfermedad.

5.1 Análisis proteómico

En los últimos años, la mayor parte de los estudios proteómicos en CCC han estado dirigidos hacia la búsqueda de **biomarcadores de pronóstico** en muestras de suero o plasma en modelos murinos y humanos. Adicionalmente, con el fin de priorizar nuevos blancos terapéuticos se ha analizado el fosfo-proteoma en modelos de infección murino. Esta estrategia ha resultado en nuevos desarrollos que han sido evaluados como posibles vías drogables (Quinasas). Sin embargo, a pesar de estos avances aún no se conocen en conjunto las alteraciones involucran la biología compleja que llevan a la progresión de la enfermedad, por tanto, para abordar este vacío en el conocimiento, nosotros utilizamos un estudio proteómico cuantitativo con marcaje isobárico (TMT).

5.1.1 Análisis proteómico diferencial del miocardio entre CCC vs Controles sanos

El análisis proteómico diferencial del miocardio entre los grupos CCC y controles sanos, nos permitió detectar 96 PED, 78 desreguladas al alza y 18 a la baja (ver tabla 8 y 9). Entre las PED en esta comparación, destaca la **Histona H1.5** (HISTH1B). La HISTH1B, pertenece a la familia de histonas unidoras (H1) y cumplen un papel importante en la organización de la cromatina, dado que facilita la unión ADN e histona dentro del nucleosoma. En nuestro estudio, la proteína HISTH1B presentó niveles aumentados en el grupo con CCC (Tabla 9). Este hallazgo es consistente con reportes en la literatura que han mostrado asociación entre sobreexpresión de ciertas variantes de las histonas H1 con cambios en la expresión génica en el miocardio con falla cardíaca (Papait et al., 2020). Además, la evidencia a partir de modelo murino indica que las regulaciones epigenéticas juegan un papel esencial en el desarrollo y patogénesis de la falla cardíaca (Liu et al., 2019). Por otra parte, se ha reportado su función en diferenciación celular y carcinogénesis (Behrends and Engmann, 2020,) sin embargo, se requieren más estudios, dado que estos datos se han centrado en el modelo de CMD y es claro que diferentes tipos de cardiomiopatía podrían tener sus propios mecanismos reguladores.

Algunas proteínas con localización y actividad en el citoesqueleto también estuvieron presentes a concentraciones más altas de lo normal, entre las proteínas detectadas destacan: γ -actina (ACTG1), coronina (CORO1A), miosina (MYL6), vimentina (VIM) y anexina (ANXA1). Estas proteínas también fueron detectadas en nuestro análisis *in silico* (Interacción proteína-proteína- STRING) haciendo parte de la red molecular (nodo), evidenciando que actúan de forma integrada, y que son efectores importantes en el acoplamiento eléctrico y mecánico en cardiomiocitos, facilitando la transducción de señales inter e intracelulares. Por su parte,

CORO1A pertenece a la familia de proteínas de unión a la actina, se expresa en gran medida en las células del linaje hematopoyético y regula la actividad celular de una manera dependiente del calcio (Pandey et al., 2022). En el músculo cardiaco la **CORO1A** se localiza en regiones de formación activa del filamento de actina, y coordinan la dinámica de la **actina** mediante la modulación del complejo Arp2/3 - Cofilina (Cai et al., 2007). Por tanto, a nivel funcional **CORO1A** vincula la plasticidad del citoesqueleto con el funcionamiento de componentes discretos de señalización del receptor de células T (TCR) (Mugnier et al., 2008). Además, esta proteína promueve la diferenciación y proliferación de células Th1 induciendo una mayor producción de IL-2 e IFN- γ (Mueller et al., 2011). Por lo tanto, estos hallazgos son congruentes con lo observado en la literatura e indican que el aumento en su expresión podría estar relacionada con la progresión de la patología. Por otro lado, **las miosinas**, funcionan como enlace entre la señalización y la dinámica del citoesqueleto, siendo las **miosinas de la clase 6 (MYL6)** proteínas únicas basadas en actina con función motora encontrándose implicadas en un amplio rango de funciones celulares entre ellas, la regulación del citoesqueleto de actina y septina. En nuestro estudio, se encontró sobreexpresión de MYL6 en el grupo con CCC. Cabe señalar, que la pérdida o sobreexpresión de MYL6 en humanos ha sido relacionada con una variedad de patologías que incluyen miocardiopatía, enfermedades neurodegenerativas y cáncer (De Jonge et al., 2019). Adicionalmente, se han encontrado mutaciones en MYL6 asociadas a cardiomiopatía dilatada e hipertrófica (Carniel et al., 2005).

Otra proteína diferencial detectada en este estudio fue la **ANXAs** la cual hace parte de un grupo de proteínas citosólicas, sensores de la concentración de Ca^{2+} que forman uniones con fosfolípidos de membrana cargados negativamente, participan en una variedad de procesos intracelulares que van desde la regulación de la dinámica de la membrana e interacciones con el

citoesqueleto, migración celular, proliferación y apoptosis (Monastyrskaya et al., 2009). En nuestro estudio, la **ANXA1** presentó niveles aumentados cuando se comparó CCC vs controles sanos. La sobreexpresión de ANXA1 se ha asociado a disminución en la infiltración de PMN e inhibición de la mieloperoxidasa mediante la activación de la vía de señalización STAT3 en modelos murinos. En líneas generales, la desregulación detectada en las diferentes proteínas citoesqueléticas revela la posible asociación de estas proteínas con cambios en la activación y modulación del citoesqueleto de actina y podría pensarse que estas alteraciones tendrían consecuencias nefastas para la función cardíaca y su incidencia en la progresión de la enfermedad.

Las vías moleculares responsables de las interacciones entre **proteínas, elementos de la matriz** y células en el corazón aún no se conocen completamente. La matriz extracelular (**ME**) es una red tridimensional, no celular, altamente dinámica que está presente en todos los tejidos y juega un papel crítico en la homeostasis y enfermedad (Frangogiannis et al., 2017). La ME no sólo funciona como un sistema de apoyo mecánico que preserva la integridad del tejido sino también sirve como un centro de señalización para la función celular y un reservorio de factores de crecimiento que pueden ser liberados como respuesta a daño, de esta manera, modula el comportamiento celular e incluso activa programas de reparación. En el tejido miocárdico normal, la ME está compuesta principalmente por **colágeno fibrilar** (tipo I, III), **glucosaminoglicanos (GAG)**, **fibronectina**, glicoproteínas y **proteoglicanos ricos en leucina (PGRL)**. Los PGRL son una gran familia de proteínas glicosiladas con una o varias cadenas de GAG y comprenden: asporin (ASPN), lumican (LUM), biglicano (BGN), decorina (DCN) y fibulina (FBLN2). Los proteoglicanos son capaces de interactuar con una variedad de receptores extracelulares (receptores de tirosin quinasa y los receptores Toll), factores de crecimiento, citocinas y moléculas asociadas a la ME, además, los proteoglicanos pueden inducir entrecruzamiento entre varias

familias de receptores y pueden también interactuar con los ligandos de estos receptores (Mak, 2020).

En el miocardio de los mamíferos los PGRL son producidos en los fibroblastos y su expresión es activada por los niveles del factor de crecimiento transformante (TGF- β), angiotensina II, y citocinas proinflamatorias. Los PGRL se unen a varios tipos de colágeno fibrilar, y en este sentido, regulan la cinética, el ensamble, la organización espacial y estabilización de las fibras (Kalamajski et al., 2010). Además, inducen la fibrosis a través de su interacción con TGF- β (Merline et al., 2009). Entre los proteoglicanos la **DCN** regula la formación de la fibra de colágeno e interactúa con una variedad de proteínas. **BGN** y **LUM** son otros dos PGRL claves que tienen expresión alterada en varios tipos de cáncer, y que cumplen un papel en las alteraciones en la ME durante el desarrollo de falla cardiaca, además se han asociado a condiciones inflamatorias y se caracterizan por su capacidad de unión al colágeno (Malemud, 2007).

En este estudio, el análisis proteómico cuantitativo detectó sobreexpresión de **LUM**, **DCN**, y **BGN**, en el grupo de pacientes con CCC frente al control sano. Estos datos concuerdan con los reportes en la literatura, donde la expresión aumentada de proteoglicanos ha sido documentada tanto en pacientes con falla cardiaca como en modelos murinos de sobrecarga de presión (Wahre et al., 2011; Engebretsen et al., 2013). Nuestros datos, sugieren un posible papel de estas proteínas en el recambio de colágeno y por ende en el remodelamiento adverso del tejido cardiaco observado en la CCC, dado que la señalización iniciada por la activación de los TLRs resulta en eventos de remodelamiento de la ME y fibrosis. Por lo tanto, podría sugerirse que, durante la falla cardiaca secundaria a CCC, las alteraciones en los componentes de la matriz extracelular miocárdica junto con la inflamación constituyen mecanismos centrales para la progresión y severidad. Por otra parte, en la comparación CCC vs controles sanos detectamos una colección de proteínas mitocondriales

significativamente disminuidas (COX7A1, ACSS1 y MT-CO2). Este resultado es consistente con estudios recientes en modelos murinos con infección por *T. cruzi* aguda y crónica en los cuales se reportan alteraciones en las proteínas mitocondriales, específicamente un declive en la actividad del complejo III, IV y en enzimas antioxidantes (Wozniak et al., 2020).

Por otra parte, el análisis de enriquecimiento de genes (GO) del conjunto de PED mostró que estas proteínas están implicadas en procesos biológicos basados en actividad estructural, organización del citoesqueleto, procesos del sistema inmune y transporte mediado por vesículas. Empleando el programa informático STRING se realizó una predicción de las interacciones entre las proteínas desreguladas, obteniendo así un interactoma. En las redes de interacción proteína-proteína, las proteínas con mayor número de interacciones podrían jugar un papel clave en el mantenimiento y balance del sistema. En la red construida con las proteínas sobreexpresadas observamos que la ACTG1 fue la proteína con más interacción. El nodo que involucró mayor número de proteínas fue el de organización del citoesqueleto, procesos inmunes seguido de organización de la matriz extracelular y en el caso de las proteínas con baja expresión el nodo que involucró mayor número de interacciones estuvo relacionado con el metabolismo de los carbohidratos. Por tanto, nuestros datos permiten corroborar, como se había descrito previamente, que procesos celulares como organización del citoesqueleto, matriz extracelular y procesos inmunes **están relacionados con la patología** (Choudhuri y Garj, 2020). Adicionalmente, nuestro análisis GO identificó como proceso alterado el transporte mediado por vesículas, el cual aún no ha sido descrito como proceso desregulado en la patogénesis de la CCC. Las vesículas extracelulares (VE) funcionan en el mantenimiento normal de la estructura cardiaca, sin embargo, cambian su composición bajo condiciones patológicas por tanto pueden verse involucradas en el desarrollo de diferentes enfermedades cardiovasculares (Fu et al., 2020). Un estudio reciente,

detectó la presencia de vesículas extracelulares, derivadas de monocitos/macrófagos, células endoteliales y linfocitos T CD4+/CD8+ en individuos seropositivos para Chagas y con síntomas, por tanto, estas organelas podrían ejercer un papel inmunomodulador de la respuesta inflamatoria a través de la señalización endocrina (De Pablos Torró et al., 2018).

5.1.2 Análisis proteómico en la comparación CCC vs CNC

El análisis proteómico de las muestras de tejido cardiaco proveniente de pacientes con CCC frente a CNC identificó 45 proteínas expresadas diferencialmente. De estas, 35 se clasificaron como sobreexpresadas y 10 se encontraron reguladas a la baja. Cabe señalar, que dentro de las proteínas sobreexpresadas detectamos un **perfil de proteínas comunes** a ambas comparaciones (CCC vs sano y CCC vs CNC). Dentro de esta lista, las proteínas más relevantes fueron: COTL1, ASPN, CORO1A, LUM, DCN, ACTG1, VIM, FBLN2 las cuales son considerados componentes arquetípicos del citoesqueleto y la matriz extracelular que están asociados al remodelamiento cardiaco y nos indican el carácter determinante de estas alteraciones en la severidad de la condición chagastica.

Coactosina (COTL1), es una proteína de unión a la F-actina, por tanto, regula el citoesqueleto de actina a través de la unión a α y β -actina (Provost et al., 2001). Además, se sabe que esta proteína interactúa con 5 lipooxigenasa (5-LOX) favoreciendo su activación y, por ende, el estado proinflamatorio a través de la síntesis de leucotrienos (Rakonjac et al., 2006). Por otra parte, se ha reportado que COTL1 está implicada en la vía de señalización del TGF- β . En el miocardio, la activación de los fibroblastos principalmente por TGF- β conduce a alteraciones en la matriz extracelular, por lo tanto, esta proteína podría cumplir un importante papel en el

remodelamiento y progresión cardiaca. En este estudio, COTL1 presentó sobreexpresión en el miocardio de pacientes con CCC en relación al grupo CNC y controles sanos. Este resultado podría sugerir un papel de la COTL1 como integrador de las señales extracelulares con procesos proinflamatorios y remodelamiento durante la fase final de la CCC.

Ahora bien, un estudio reciente, utilizando un modelo de isquemia miocárdica identificó a COTL1 como una de las proteínas que interactúa con *Cfast* un transcrito (ARNs no codificantes largos - lncRNA) asociado a los fibroblastos cardiacos. Los autores demuestran que *Cfast* inhibe de forma competitiva la interacción de COTL1 con TRAP1 (Proteína asociada a receptor TGF- β), es decir *Cfast* ocupa los sitios de interacción de la COTL1 con TRAP1. Al quedar libre la proteína TRAP1, esta puede unirse al complejo SMAD2/SMAD4, activando la vía de señalización inducida por TGF- β y promoviendo así los procesos de fibrosis (Zhang et al., 2020). En este sentido, los autores proponen que la sobreexpresión de esta proteína (COTL1) favorecería la unión de más moléculas de TRAP1 y por tanto, podría considerarse como modulador de la fibrosis. No obstante, se requieren nuevos estudios que confirmen el papel de la COTL1 y sus mecanismos reguladores de la fibrosis.

Por otra parte, uno de los hallazgos más robustos en la comparación CCC vs CNC, se relaciona con la detección de un conjunto de proteínas y glicoproteínas pertenecientes a la **ME**. Como ya lo habíamos mencionado, la ME del cardiomiocito se compone de una red de moléculas y proteínas como colágeno, elastina, proteínas microfibrilares, proteínas de adhesión y proteoglicanos (Karamanos et al., 2021). Nuestro análisis detectó sobreexpresión en cinco tipos diferentes de proteoglicanos (lumican, asporina, decorina, fibulina y biglicano), los cuales fueron comunes a ambas comparaciones (CCC vs sano y CCC vs CNC). Este hallazgo es consistente con

otros estudios que han usado el análisis proteómico para investigar la variación de proteínas en las enfermedades cardíacas (Schecheter et al., 2014).

Lumican, decorina, y biglicano son PGRL que controlan las propiedades espaciales del tejido en desarrollo y la homeóstasis dado que ellos retienen los factores de crecimiento en el ambiente y también regulan la fibrilogénesis (Iozzo y Schaefer, 2015). Además, son moduladores de los estados normales (homeóstasis, reparación del tejido y senescencia) y de las condiciones fisiopatológicas (inflamación, fibrosis, autofagia y cáncer) (Diehl et al, 2021).

La **asporina (ASPN)** pertenece a la familia de proteínas con repeticiones ricas en leucina (LRR) y regula la condrogénesis a través de la vía de señalización del TGF- β . Esta proteína también puede unirse al colágeno y al calcio y puede inducir mineralización del colágeno (Kaliakatsos et al., 2006). Estudios previos, realizados en modelos murinos con remodelamiento inducido por constricción aórtica transversa (TAC), han demostrado que la sobreexpresión de ASPN se asocia con remodelamiento patológico inducido por sobrecarga (Wang et al., 2019, Medzikovic et al., 2020). Sin embargo, en la CCC no se conoce aún el papel de la ASPN en el desarrollo de la fibrosis intersticial. En nuestro estudio, la **ASPN** presentó niveles aumentados en los pacientes con CCC frente al grupo con CNC y sanos confirmando lo observado por estudios publicados hasta la fecha respecto a la asociación entre los niveles aumentados de esta proteína y el remodelamiento cardíaco.

Las **coroninas** pertenecen a la familia de proteínas de unión a la actina y se caracterizan porque regulan el citoesqueleto (Chan et al., 2011). **CORO1A**, coordina el desensamble del filamento de actina, promoviendo el desdoblamiento de la fibra y facilitando que el complejo cofilina- Arp2/3 inicie la disrupción o despolimerización de monómeros de actina. Si bien, parece probable que la sobreproducción de esta proteína pueda contribuir al desensamble de los elementos

contráctiles y eventualmente provocar inestabilidad del miocardio. Sin embargo, como lo mencionamos antes, estas proteínas también modulan el sistema inmune y actúan como reguladores esenciales del balance entre señales de supervivencia y apoptosis en las células T vírgenes (Mueller et al., 2011). Así la producción aumentada de **CORO1A** podría estar modulando la activación de la respuesta inmune (Tokarz-Deptuła, et al., 2016)

A partir de las evidencias histológicas halladas en nuestro estudio en donde se observa una amplia afectación o pérdida de fibras miocárdicas, aunado a los cambios detectados en el perfil proteico a nivel de proteínas del citoesqueleto y matriz extracelular, podría pensarse que estos cambios proteicos podrían estar implicados en la patogenia de la insuficiencia cardíaca con fracción de eyección reducida observada en la fase final de la CCC. En conclusión, el **análisis proteómico diferencial** en el tejido miocárdico de los pacientes con CCC frente a CNC y controles sanos mostró sobreexpresión de diversas proteínas involucradas en procesos biológicos como: organización del citoesqueleto, matriz extracelular y respuesta inmune. Nuestros datos proveen nuevo conocimiento relacionado con los mecanismos moleculares subyacentes a la falla cardíaca en pacientes con CCC, y permiten elucidar la dinámica de estos mecanismos, los cuales contribuyen a la progresión de la falla cardíaca. Importante señalar que los cambios en el perfil y bioquímica de los componentes de la matriz extracelular podrían estar críticamente implicados en la **patogénesis de la falla cardíaca**.

5.2. Análisis metabólico

Actualmente, la falla cardíaca es considerada como un síndrome clínico complejo que puede resultar como consecuencia de alteraciones estructurales o funcionales que conducen

finalmente a la disfunción del ventrículo para llenar y eyectar de las cavidades cardiacas, la sangre a todo el organismo (Stanley et al., 2005). Evidencia reciente apoya el concepto de que alteraciones en el metabolismo del cardiomiocito podrían contribuir a la disfunción contráctil y a la progresión y remodelamiento característico de la falla cardiaca (Sun et al., 2021).

5.2.1 Análisis metabólico diferencial en la comparación CCC vs Sano

En la comparación CCC vs controles sanos se identificaron de forma significativa un total de 40 metabolitos. Estos metabolitos estuvieron relacionados con diferentes vías metabólicas, de las cuales las primeras cinco correspondieron a metabolismo de alanina, aspartato y glutamato, ciclo de la urea, metabolismo de arginina y prolina, síntesis de carnitina y efecto Warburg. La mayoría de los metabolitos se observaron disminuidos de forma significativa y estuvieron relacionados con procesos de obtención de energía como: glicólisis, ciclo del ácido tricarboxílico, vía de las pentosas y fosforilación oxidativa.

Aminoácidos como substratos metabólicos, los aminoácidos cumplen un importante papel en la fisiología cardiaca actuando en el metabolismo energético, en procesos biológicos redox, homeostasis del calcio y bajo condiciones de estrés prolongado o isquemia y como substratos metabólicos. Algunos aminoácidos como el **aspartato**, glutamato, glutamina, asparagina y aminoácidos de cadena ramificada (AACR) son usados preferencialmente como substratos anapleróticos en el ciclo de Krebs (Drake et al., 2012). Nuestro análisis metabólico, encontró en el grupo CCC niveles disminuidos en la mayoría de los aminoácidos detectados, éstos fueron: lisina, citrulina, metionina, l-alanina, glutamina, asparagina y arginina. En contraste, nuestro análisis detectó aumentado el aspartato (FC= 1.83 p=0,0007).

Estos hallazgos evidencian baja disponibilidad de sustratos y la incapacidad del cardiomiocito, en esta fase tardía de la falla cardíaca de obtener energía a partir de la glicólisis y la oxidación de la glucosa. En condiciones normales, el metabolismo de aminoácidos en el miocardio produce una muy pequeña cantidad de ATP cardíaco, no obstante, en condiciones de estrés en el miocardio, los aminoácidos llegan a ser fuente importante de energía, así como sustrato para la síntesis de moléculas de señalización y otras estructuras celulares. Los datos obtenidos aquí sugieren que este aminoácido (aspartato), probablemente, está siendo tomado del ambiente y convertido a **oxaloacetato** (intermediario del ciclo Krebs) y así luego podría ser convertido en piruvato y consecuentemente estar siendo transportado hacia el hígado para ser introducido en la vía de la gluconeogénesis.

Por su parte, el glutamato y la glutamina son reconocidos por su habilidad para convertirse a α cetoglutarato el cual es un intermediario del ciclo de Krebs; en nuestro estudio se detectaron niveles disminuidos de estos aminoácidos, lo cual soporta la idea de que el ciclo de Krebs no está siendo activado. Glutamina en particular, uno de los principales aminoácidos intracelulares en los cardiomiocitos, juega un papel central en la biosíntesis de nucleótidos y proteínas actuando como un donador de nitrógeno y energía. La significancia biológica de los cambios en los niveles de glutamato y glutamina son notables. La glutamina es un regulador clave de la homeostasis dado que inhibe la degradación de proteínas. Además, la glutamina es considerada un importante nutriente biosintético y energético para los linfocitos T y B, actúa como el “combustible del sistema inmune” (Wasinski et al., 2014), dado que una baja concentración en sangre puede alterar la función de las células inmunes (Cruzat et al., 2018). Por lo tanto, una deficiencia en la glutamina podría causar perturbaciones en los eventos tardíos de la activación de los linfocitos T, particularmente, a nivel de la proliferación y secreción de citocinas (Ren et al., 2017). Más aún, se

ha demostrado que el glutamato actúa como una molécula inmunomoduladora (Wu et al., 2019). Nuestros datos muestran una disponibilidad limitada de glutamina celular, lo cual podría incidir en el fenotipo de respuesta inmune basada en las células T, sin embargo, deben realizarse más estudios para validar esta hipótesis. Finalmente, la depleción en la concentración de AACR y sus metabolitos no solo podrían contribuir en la patogénesis de la enfermedad, sino también tendrían potencial como futuros biomarcadores para falla cardíaca. Nuevas aproximaciones terapéuticas dirigidas para corregir la pérdida de la actividad catabólica podrían ser probadas como estrategias eficaces para detener la progresión de la FC (Nie et al., 2018).

Significancia de la síntesis de carnitina y fosfolípidos, un hallazgo interesante en este estudio fue la disminución observada en los niveles de diferentes acil-carnitinas (orto-malonil l-carnitina, hidroxil isovaleroil carnitina y tiglilcarnitina) así como también en algunos ácidos grasos de cadena larga (AGCL). Sin embargo, se detectó mayor expresión de una única clase de acil-carnitinas (metilmalonil-carnitina) en el grupo con CCC.

Las acil carnitinas, son las moléculas encargadas del transporte de AGCL a la mitocondria. Una vez los AGCL son internalizados pueden ser utilizados como sustrato para la producción de energía mediante el proceso conocido como **β -oxidación de los ácidos grasos (β -OAG)** (Makrecka-Kuka et al., 2017). El transporte de AGCL desde el citosol hasta la mitocondria es regulado por un sistema de transporte dependiente de las carnitinas e involucra la enzima carnitina palmitoil transferasa-1 (CPT-1). La enzima CPT-1 es inhibida por malonil CoA y activada por la presencia de acil-carnitina, de ahí que, los niveles aumentados de acil carnitinas favorecerán la obtención de energía (a partir de la oxidación de los ácidos grasos e incluso una mayor tasa de sobrevivencia, tal como ha sido observado en los estudios con cardiomiocitos humanos y en

modelos murinos de infección gastrointestinal causada por *T. cruzi* (Besikci et al., 2003; Van Weeghel et al., 2018; Hossain et al., 2020).

Nuestros datos demuestran alteraciones en los niveles de diferentes tipos de carnitinas, la mayoría se detectaron muy disminuidas, sin embargo, resulta interesante señalar que un derivado de las carnitinas, malonil carnitina, fue detectada estar aumentada. Lo anterior, podría explicarse al menos en parte, a que este metabolito se acumula cuando hay alteración específica de la oxidación de los ácidos grasos causada por la entrada alterada de ésteres de acilcarnitinas (Hoppel, 2003) por tanto, podría suponerse que los AGCL no pueden ser transportados eficazmente a la matriz mitocondrial para su oxidación y posterior utilización en el ciclo de Krebs y producción de cuerpos cetónicos.

Algunos estudios han mostrado que la alteración en la β -OAG está asociada con cardiomiopatía (Guertl et al., 2000). Utilizando secciones de tejido cardiaco en modelos murinos de infección por *T. cruzi* y mediante una aproximación metabolómica se demostró una asociación entre disminución de algunos miembros de la familia de carnitinas y desenlace fatal (McCall et al., 2017). Además, ha sido demostrado que los ácidos grasos de cadena larga y corta juegan un papel diferencial en el metabolismo energético del músculo cardiaco, respuesta al stress y manejo del daño oxidativo (Chintapalli et al., 2016). De otra parte, la suplementación con carnitina en modelos murinos en fase aguda de la infección por *T. cruzi*, previno la mortalidad mediante la mitigación de las alteraciones metabolómicas inducidas por la infección (Hossain et al., 2020).

Cabe señalar, que nuestros datos detectaron niveles reducidos de ácidos grasos insaturados (Palmitoleico) y saturados (PC: 15:0/0:0) en el tejido cardiaco de pacientes con CCC. Estos hallazgos coinciden con datos previos que muestran disminución en la expresión de las enzimas

miocárdicas involucradas en la β -OAG en pacientes con falla cardiaca y que se sometieron a trasplante cardiaco (Sack et al., 1996).

De otra parte, la β - OAG cumple un importante papel en la regulación de la respuesta de las células T. Estudios recientes, confirman que β -OAG regula el balance entre las subpoblaciones de células T efectoras pro-inflamatorias y células T reguladoras (Treg), y promueve el mantenimiento de la subpoblación de células T de memoria (O'Neill et al., 2016). Las células Treg presentan aumento en la β -OAG en relación a las cels Th1, Th2 y Th17, además, promueve la generación de células Treg mientras inhiben la polarización de las células T efectoras (Michalek et al., 2011). Es más, estudios recientes mostraron que la estabilidad del linaje y función de las Treg está influenciada significativamente por las condiciones ambientales y la disponibilidad de ciertos metabolitos, por tanto, nuestros datos podrían sugerir que los niveles disminuidos de AG, su composición y oxidación podrían dar como resultado alteraciones de la función miocárdica y en las funciones efectoras de las células inmunes, sin embargo, se requieren más estudios para comprobar esta hipótesis.

Significancia del glicólisis, es sabido que la falla cardiaca conduce a cambio en la preferencia del sustrato desde los AG a glucosa (Lopaschuk et al., 2010). Por su parte, la glicólisis se relaciona con la vía de las pentosas, con el ciclo de Krebs y vía biosintética de la hexosamina. Nuestros resultados identificaron siete de nueve intermediarios de la vía glucolítica, de los cuales fructosa 6 fosfato y lactato se encontraron disminuidos significativamente en los pacientes con CCC. Mientras 2 y 3- fosfoglicerato estuvieron aumentados. Otros metabolitos como glucosa y piruvato se observaron ligeramente aumentados en el miocardio de pacientes con CCC. Estos datos sugieren que la vía glucolítica no está operando de manera óptima. La glucosa provee una pequeña pero significativa cantidad de ATP a través de la fosforilación en la vía glucolítica. El piruvato

producto final de la glicólisis puede ser reducido a lactato, transaminado a alanina, carboxilado a oxaloacetato y más importante oxidado a acetil CoA (Gray et al., 2014). Una escasa cantidad de piruvato puede indicar disminución a través de la vía glucolítica dando como resultado alteración en la transferencia de energía y por lo tanto alteración en la función cardiaca. También, algunos autores han reportado dificultades para controlar adecuadamente los niveles de metabolitos derivados de la glucosa los cuales podrían estar implicados en la generación de especies reactivas de oxígeno (Sarre et al., 2012). Nosotros hipotetizamos que los niveles disminuidos de los intermediarios de la vía glicolítica podrían ser atribuidos a aumento en el eflujo metabólico de algunos intermediarios de la glicólisis hacia otras vías acopladas a ella tales como: la vía de las pentosas dado que la evidencia en la literatura (otras cardiomiopatías) sugiere que la presencia de oxidantes induce el flujo de glucosa en la vía de las pentosas dentro de segundos y que múltiples ciclos de la molécula de carbón en PPP potencialmente amplifica la producción de NADPH (Verma et al., 2017; Wang et al., 2022).

De otra parte, en los últimos años se ha alcanzado una comprensión más holística de la dinámica entre el metabolismo cardiaco, la actividad funcional de cardiomiocitos y las células de respuesta inmune. Actualmente, se conoce que las células inmunitarias (Cels T efectoras, macrófagos) infiltradas en el tejido, experimentan cambios fenotípicos y funcionales en respuesta a diversos estímulos y cambios en el microambiente como: disponibilidad de nutrientes, tensión de oxígeno, acidificación y presencia de metabolitos. De hecho, a la habilidad de las células para cambiar su metabolismo y alcanzar una adaptación que le permita sobrevivir en su nuevo entorno se ha denominado reprogramación metabólica (RM). La RM directamente controla la función de las células T, y confiere a las células distintos fines funcionales. Estos cambios funcionales pueden abarcar diversos procesos como: proliferación, diferenciación, y funciones efectoras. Cabe señalar

que estos cambios se realizan mediante la regulación del equilibrio entre: la generación y utilización de energía, la catabolismo y biosíntesis de macromoléculas, homeostasia redox, ambiente epigenético, y transducción de señales (O'Neill, 2016). Datos disponibles sugieren que las Treg cambian su metabolismo dependiendo de las señales inmunes que reciben y de la disponibilidad de sustratos, por tanto, las Treg pueden ser susceptibles al microambiente, lo cual es crítico para su proliferación, sobreexpresión de moléculas supresoras y migración (Priyadhashini et al., 2018).

Estudios previos en pacientes con infección asintomática por *T. cruzi* han encontrado aumento en la frecuencia de las Treg en la sangre periférica, comparado con pacientes sintomáticos con cardiomiopatía severa (Yang et al., 2016) sugiriendo que las subpoblaciones Treg podrían estar involucradas en el control de las respuestas patológicas de las células T durante la CCC. En particular, la glicólisis y sus productos intermediarios podrían alterar la estabilidad y capacidad supresora de la Treg dado que la disponibilidad de nutrientes podría modular la expresión de **FOXP3** y perturbar la actividad de Treg supresoras (De Rosa et al., 2007), sin embargo, aún no es claro el efecto de la RM de las Treg sobre la patogénesis de la CCC.

Ciclo de los ácidos tricarboxílicos (ATC), en este estudio detectamos cinco intermediarios del ciclo de los ATC, los cuales fueron: cis aconitato, ácido succínico, malato, fumarato y 2 metilcitrato. Los cinco metabolitos se encontraron disminuidos de forma significativa en el grupo con CCC. Estos datos concuerdan con un estudio realizado en modelo murino con cardiomiopatía dilatada donde también se evidenció disminución en la concentración de los intermediarios del ciclo de los ATC; así como, en algunos tipos de carnitinas (West et al., 2016). Teniendo en cuenta nuestros hallazgos, los cambios detectados sugieren una reducida actividad del ciclo de Krebs y por ende, en los complejos de la cadena electrónica, lo cual podría contribuir a una capacidad

reducida del cardiomiocito para la generación de ATP llevando así a una disminución de la función cardíaca.

Estrés oxidativo, estudios realizados en cardiomiocitos obtenidos de murinos con CCC han mostrado aumento de aductos oxidativos, de especies reactivas de oxígeno (ROS) y nitrógeno (RNS). Además, se observó disminución en la fosforilación oxidativa, como resultado de estrés mitocondrial (Gupta et al., 2009). En el miocardio, uno de los principales antioxidantes es el **glutati6n (GSH)**, el cual puede interactuar directamente con especies reactivas de oxígeno o nitr6geno (ROS/RNS) o como cofactor para varias enzimas en diferentes sistemas. El **GSH** es una mol6cula 6nica que participa en aspectos esenciales de la homeostasis celular, teniendo un rol central en la defensa contra el da6o oxidativo. El GSH es un trip6ptido hidrosoluble formado por los amino6cidos: 6cido glut6mico, ciste6ina y glicina que se encuentra presente en el citoplasma de todas las c6lulas. En este estudio, se detectaron bajos niveles de **5-oxoprolina** en el grupo de pacientes con CCC. La depleci6n de las reservas antioxidantes end6genas podr6a resultar en una elevada concentraci6n de ROS y contribuir al estr6s oxidativo. Adicionalmente, el aumento del estr6s oxidativo puede alterar la liberaci6n de citocinas antiinflamatorias tales como IL-10, as6 como contribuir al desarrollo de procesos inflamatorios en el coraz6n (Cominacini et al., 2000).

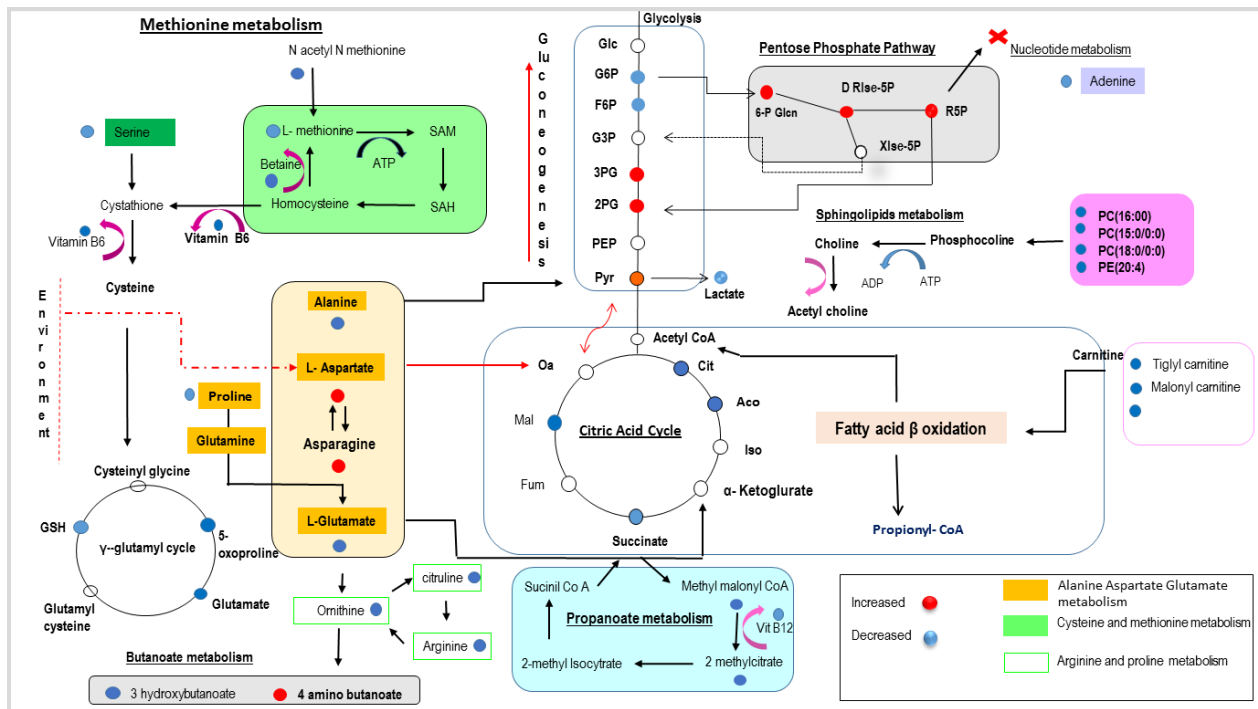
Por otra parte, la v6a de la trans-sulfuraci6n merece especial menci6n debido a que esta v6a es particularmente activa en el cardiomiocito (Nandi et al., 2017), donde la homociste6ina puede ser sintetizada a partir de metionina y convertida a glutati6n (Mosharov et al, 2000). En este trabajo, nosotros detectamos niveles disminuidos de forma significativa de **N acetil N metionina**, metionina, betaina y vitamina B6 en el tejido de pacientes con CCC, lo cual sugiere una desregulaci6n del sistema antioxidante, lo cual podr6a conducir a estr6s oxidativo y alteraci6n en la funci6n card6aca. Adem6s, se ha se6alado que el ciclo de la homociste6ina-metionina es un sensor

metabólico y que su supresión determina la hipometilación de histonas en enfermedades autoinmunes y cardiovasculares (Shen et al., 2020).

Finalmente, esta comparación demostró que en la fase avanzada de la CCC hay alteraciones en algunas **vías metabólicas** y en la actividad de la cadena respiratoria (Figura 45). En general los resultados muestran niveles disminuidos de la mayoría de los metabolitos detectados en el grupo con CCC. Teniendo en cuenta que el metabolismo de los ácidos grasos, la glucosa y los aminoácidos juegan un rol importante ya que estas vías modulan procesos celulares como proliferación, diferenciación y respuestas inflamatorias en miocitos y componentes celulares del miocardio no miocíticos (células respuesta inmune), podría suponerse que en el evento de perturbaciones en la vía de la oxidación de los ácidos grasos y en ausencia de aumento en la oxidación de la glucosa, otras vías metabólicas llamadas compensadoras podrían ser activadas con el fin de mantener el flujo a través del ciclo de Krebs para la síntesis de ATP, incluso hipotetizarse que el **aspartato** está siendo usado como un substrato glucogénico. Adicionalmente, el remodelamiento del ciclo de Krebs podría generar cambios que alterarían el balance entre activación de la inflamación versus resolución de la misma. Así mismo, los niveles disminuidos observados en las moléculas antioxidantes podrían promover inflamación en el tejido. Nuestros hallazgos sugieren que este **estatus metabólico** caracterizado por disminución en los substratos energéticos y pérdida del balance pro y antiinflamatorio podría tener efecto profundo sobre el fenotipo y función de las células T infiltrantes en el miocardio, ya que estas finalmente podrían estar condicionando la lesión y por ende el fatal destino del estroma miocárdico observado en la fase final de la CCC.

Figura 45.

Integración de diferentes vías metabólicas involucradas en la comparación CCC vs sano.



Nota. En rojo los metabolitos que se encontraron aumentados y en azul aquellos que fueron detectados disminuidos.

5.2.2 Análisis metabólico CCC vs CNC

Nuestro análisis metabólico mostró que algunos metabolitos derivados del proceso catabólico del triptófano (TRYP) estuvieron desregulados. TRYP es el aminoácido esencial menos abundante y es metabolizado a través de dos importantes vías (Figura 46). La primera, conocida como la vía de la serotonina (VS), se encarga de la conversión de triptófano a 5-hidroxitriptófano, serotonina y melatonina. La segunda ruta corresponde a la **vía de la quinurenina (VQN)**. Una vía metabólica en la que el aminoácido esencial triptófano se metaboliza en el cofactor NAD^+ a lo largo de varios pasos enzimáticos. En esta vía el TRYP es transformado en L-formil quinurenina (L-FQ), quinurenina (QN), 3 hidroxiquinurenina (3HQN), 3-hidroxiantránico (3HAA) y

ácido quinolínico (AQ). Esta última vía, es activada por la enzima **indolamino 2,3 di oxigenasa (IDO)**, la cual se localiza tanto en las células inmunitarias como en las células endoteliales (Wang et al., 2014.). **IDO** es considerada como el paso limitante en la VQN, y es responsable de la depleción del triptófano. La IDO emerge como un regulador de diferentes condiciones patológicas, entre estas el infarto de miocardio. IDO podría jugar un papel clave para regular la homeostasis cardíaca (Melhem, et al., 2021). La expresión de IDO por parte de las células dendríticas es regulada por la activación del factor de transcripción activado por un ligando, el receptor de hidrocarburos de arilo (AHR), lo que lleva a la producción de QN (Pallotta, et al., 2014).

Reportes previos, han relacionado la expresión aumentada de los metabolitos y enzimas de la vía de la quinurenina a diversas patologías, principalmente neurológicas y cardiovasculares (Adams et al., 2012, Song et al., 2017). Algunos metabolitos intermediarios de la VQN han sido relacionados con importantes aspectos de la fisiopatología de la insuficiencia cardíaca, como inflamación, homeostasis energética, apoptosis y estrés oxidativo (Lund et al., 2020). En particular, QN, 3HQN Y 3HAA son capaces de suprimir la proliferación de las células, también, han sido asociados con un efecto inmunosupresor en cáncer mediado por la depleción del TRYP y apoptosis por acumulación de catabolitos inmunosupresores tales como QN. Mas aún, se sabe que la QN favorece el estrés oxidativo lo cual conlleva a la disfunción y apoptosis de las células endoteliales tanto *in vivo* como *in vitro* (Duran y San Martín, 2014). De otra parte, estudios en modelos murinos, han mostrado que altos niveles de 3HAAA inducen apoptosis en células Th1 y en células T efectoras CD8⁺ (Xu et al., 2008), bloquea la señalización del óxido nítrico en macrófagos conduciendo a la expansión de las células inmunosupresoras y a la pérdida de las células inmuno-competentes (Bostian y Eoff, 2016). En la infección crónica por *T. cruzi* el perfil de citoquinas se desplaza hacia las citoquinas Th1, como el IFN- γ , y se suprimen las citoquinas

Th2, como la IL-4 (Marin-Neto et al., 2007). Por tanto, IFN- γ es liberado durante la respuesta inmune mediada por células y es claro que niveles elevados de esta citocina inducirían una mayor activación de IDO y consecuentemente la formación de algunos metabolitos derivados de la quinurenina con actividad inmunomoduladora. En la comparación CCC vs CNC, nuestros resultados muestran niveles disminuidos de triptofanoamida (precursor del triptófano) y 5-hidroxitriptófano (*Fold change*: -7.02 y -3.34 respectivamente), y aumentados de **N formil quinurenina** (precursor de la quinurenina) (*Fold change*: 4,47). Lo anterior evidencia que durante la CCC el metabolismo del triptófano está siendo direccionado a través de la VQN y no a través de la serotonina. Estos resultados son concordantes con lo reportado por Girones y colaboradores, quienes usando modelos murinos infectados con *T. cruzi* encontraron alterados diferentes vías metabólicas y/o sus metabolitos los cuales podrían estar siendo afectadas por la infección, entre las vías están: metabolismo de los nucleótidos, triptófano, y fenilalanina (Girones et al., 2014). Así como también, son coincidentes con lo reportado por Hossain y col, los cuales utilizando modelos murinos con infección aguda o crónica por *T. cruzi* detectaron de forma significativa en el intestino grueso, niveles aumentados de fosfatidilcolina y quinureninas mientras que el triptófano se encontró muy disminuido (Hossain et al., 2019).

En línea con lo anterior, se conoce que el aumento del catabolismo del triptófano a QN a través de la IDO se asocia con un **desequilibrio en la función inmunitaria** (Gaspar R et al., 2021). La evidencia ha atribuido varias funciones inmunomoduladoras a los compuestos producidos en la VQN, además, se sabe que estos metabolitos pueden ejercer efectos sobre la misma célula productora de QN (acción cis) (Proietti et al., 2020) y sobre células distintas (acción trans) (Munn et al., 2013), principalmente de forma dependiente de receptores.

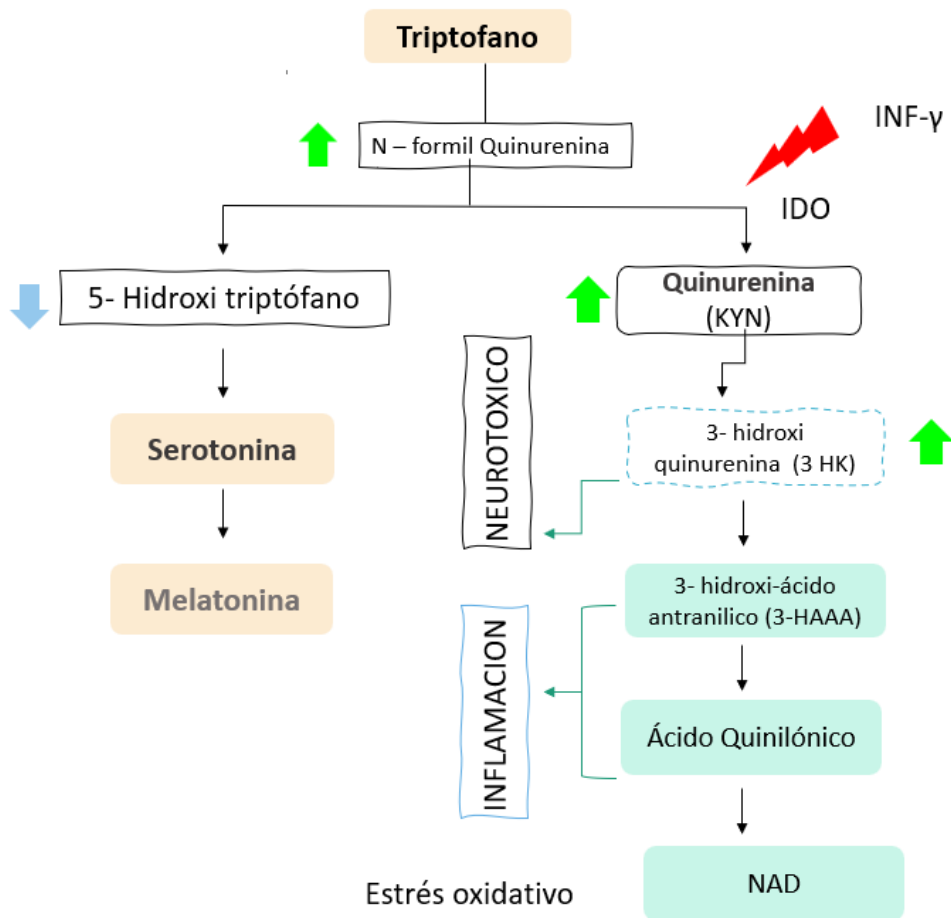
Uno de los receptores que es activado por la quinurenina es el receptor de arilhidrocarburos (AhR), este receptor es expresado en ciertos subtipos de linfocitos T (LT vírgenes, Th17, Treg). Ha sido demostrado que la activación del receptor AhR por parte de la QN podría ser clave en la diferenciación de las células Th17 a Tregs. (Mezrich, JD et al., 2010). Además, se ha observado que la activación de la QN por parte de la AhR estimula la expresión de la enzima IDO1, que genera QN al degradar el triptófano, lo que representa un bucle de retroalimentación positiva que puede vincular la inflamación con la producción de ROS (Kaiser et al., 2020)

Otra molécula relacionada con la modulación de la VQN es la molécula diana de rapamicina en células de mamífero (mTOR). Este es un sensor de estrés metabólico e integrador de señales ambientales (Perl, 2015). Ahora bien, si consideramos de manera conjunta la depleción del triptófano y el aumento de la QN, estos efectos inducen a la célula a un estrés metabólico, el cual es detectado por mTOR y la cadena zeta del complejo TCR, lo que a su vez conduce a un deterioro del metabolismo de las células T e induciría cambios en el fenotipo celular (Munn et al., 2013). Es importante señalar que en la fase inicial de la lesión cardíaca las Tregs son beneficiosas al suprimir las respuestas inflamatorias excesivas y promover la reparación del tejido, sin embargo, en la falla cardíaca crónica, los fenotipos y las funciones de las Tregs cambian, se transforman en un tipo celular antiangiogénico y profibrótico.

Otros intermediarios 3HQN, y AQ además de la QN han sido asociados con inflamación, estrés oxidativo y disfunción endotelial (Wang et al., 2017), Sin embargo, aún no se conoce completamente, cuales serían los efectos de los intermediarios metabolismo del triptófano sobre la modulación de la inflamación en la CCC.

Figura 46.

Modelo esquemático de las vías de degradación del triptófano.



Nota. En la figura se señalan con una flecha los metabolitos que se encontraron alterados en relación con esta vía metabólica en la comparación CCC vs CNC. Flecha color verde representa los metabolitos que se observaron aumentados (N formil quinurenina, quinurenina y 3 hidroxiquinurenina). Flecha color azul indica concentración disminuida de 5 hidroxi triptófano.

En este estudio, también encontramos niveles aumentados de 9,12,13 triHOME. Este metabolito es derivado del ácido linoleico al ser metabolizado por el sistema citocromo P450. **9,10,13 triHOME** es también conocido como oxilipina (lípidos oxigenados). Las oxilipinas han sido asociadas con stress oxidativo e inflamación. Algunos estudios indican que triHOME induce

respuestas proinflamatorias incluyendo la generación de citocinas inflamatorias tales como IL-1 β e IL-18 (Fuchs, 2020).) Teniendo en cuenta que la CCC se caracteriza por alteraciones en el balance proinflamatorio vs antiinflamatorio, podría pensarse que niveles elevados de este metabolito podría estar contribuyendo al perfil inflamatorio predominante en estos tejidos.

En general, la **adaptación metabólica** de las células inmunes está fuertemente afectada por el microambiente del sitio (fenotipo inflamatorio, disponibilidad de substrato energético, etc), por lo tanto, cambios metabólicos en las células inmunes pueden contribuir a respuestas inmunes disfuncionales. El miocardio bajo condiciones de estrés como las observadas durante la CCC, conduce a la formación de metabolitos inmunomoduladores las cuales afectarán las células de respuesta inmune, proteínas de citoesqueleto y matriz extracelular, contribuyendo así a la patogénesis de la enfermedad. En cualquier caso, nuestros datos son interesantes si consideramos que una desregulación del metabolismo del triptófano en el miocardio a expensas de la síntesis de serotonina parece estar involucrada en la progresión de la CCC.

5.3 Análisis integrado de proteínas y metabolitos diferenciales

5.3.1 Análisis integrado de proteínas y metabolitos diferenciales en la comparación CCC vs CNC

5.3.1.1 Análisis de vías canónicas. Vías asociadas a transducción de señales, el análisis de vías canónicas de los metabolitos y proteínas expresados diferencialmente en la comparación CCC vs CNC, realizado en el software IPA, mostró que **cuatro** de las diez primeras vías canónicas detectadas de forma significativa estuvieron relacionadas con mecanismos de señalización mediante GTPasas de la familia Rho, incluyendo las vías de señalización RhoA y RhoGDI

(inhibidor de la disociación GDP de Rho). Las GTPasas de la familia Rho son proteínas de unión al GDP/GTP, regulan la estructura del citoesqueleto, la protrusión celular y la migración. RhoA es una proteína esencial durante el desarrollo embrionario del corazón, su actividad la realiza mediante la inducción de proliferación y diferenciación del cardiomiocito (Kaarbo et al., 2003). En contraste, RhoGDI actúa como regulador negativo de RhoA (Dirac-Svejstrup et al., 1997; Ota et al., 2015). Estudios previos sugieren que la vía de señalización RhoA contribuye al desarrollo de las enfermedades cardiovasculares, incluyendo fibrosis, hipertrofia y subsecuente falla cardíaca (Shimizu y Liao, 2016). Nuestro análisis *in silico* detectó de forma significativa activación de la vía de señalización (RhoA) (Score $Z=>2$), e inhibición de la vía de señalización RhoGDI (Score $Z=<2$). Estos resultados están en línea con resultados obtenidos en estudios previos, realizados en modelos murinos donde la sobreexpresión de RhoA resultó en disfunción atrioventricular con dilatación del ventrículo izquierdo y disminución en la contractilidad (Sah et al., 1999). Mas aún, un estudio reciente, en modelo murino de cardiomiopatía dilatada encontró que la inhibición de esta vía (RhoA) limitó el desarrollo de fibrosis miocárdica (Wang et al., 2020). Por tanto, podría pensarse que la desregulación de esta vía de señalización (Rho) probablemente sea crítica en el proceso fisiopatológico de la CCC.

Vías asociadas a mantenimiento celular, otro hallazgo del análisis de vías canónicas indicó que la vía “**biosíntesis de las carnitinas**” podría estar involucrada en la patogenia de la CCC. Este hallazgo es consistente con un estudio previo, realizado en modelo murino de infección con *T. cruzi* el cual reveló cambios en la abundancia de la acilcarnitinas (Mac Call et al., 2017). La L-carnitina regula la utilización de los ácidos grasos en el tejido cardíaco, por tanto, su deficiencia suscita eventos metabólicos que llevan a alteraciones en el metabolismo energético cardíaco. Por otra parte, cabe señalar que algunos investigadores han examinado el potencial benéfico del uso

de la L-carnitina en el manejo de pacientes con cardiomiopatía dilatada (Weng et al., 2021; Sayed-Ahmed et al., 2019) y en modelos murinos infectados con T.cruzi (Hossain et al., 2020)

Nuestros resultados evidencian alteraciones profundas en el metabolismo energético del tejido cardíaco con CCC. Podría plantearse que como respuesta frente al desbalance en carnitinas y AG, los cardiomiocitos activarían cambios en la expresión génica que permitirán compensar el déficit energético. Estos nuevos mecanismos adaptivos con el tiempo podrían inducir numerosos efectos deletéreos que van más allá de las alteraciones en la producción de energía y que incluyen: aumento en la generación de radicales libres, estimulación de la apoptosis e inducción de la disfunción ventricular izquierda. Finalmente, todas estas alteraciones probablemente contribuirán al remodelamiento patológico del tejido.

Vías asociadas a ensamble, organización y migración celular, nuestro análisis de vías canónicas identificó de forma significativa **cuatro** vías asociadas a movilidad celular y organización del citoesqueleto. Estas vías fueron: mecanismos de salida viral de las células del hospedero, remodelamiento y señalización de las uniones epiteliales adherentes, y señalización de la endocitosis mediada por caveolas y señalización del citoesqueleto de actina. Algunas de las proteínas identificadas en nuestro estudio como sobreexpresadas (coactosina, actinas, miosinas, coatomero y lamininas) y otras detectadas con tendencia a la baja o disminuidas (Proteína LIM) están involucradas en la **movilidad, estructura, integridad**, y señalización intercelular, así como también con tráfico vesicular (Vafiadaki,2015). Estos resultados nos permiten suponer que los mecanismos fisiopatológicos subyacentes a la falla cardíaca chagásica afectan la arquitectura del tejido, la transmisión de señales mecánicas, la conformación de los sistemas de membrana y la organización de las miofibrillas y por tanto estos mecanismos tendrán efectos deletéreos directos sobre la generación de fuerza de los cardiomiocitos. En línea con nuestros resultados se encuentran

los estudios experimentales en los cuales se ha descrito el papel de las alteraciones del citoesqueleto, especialmente de los microtúbulos y la desmina, en la hipertrofia e insuficiencia cardíaca (ICC) (Caporizzo al, 2020). Más aún, hay reportes de alteraciones en la distrofina y proteína LIM del músculo como posibles causas de la falla cardíaca (Hein, 2000).

Vías asociadas a respuesta inmune, por otra parte, partiendo del tipo y número de vías canónicas detectadas en el análisis, observamos que las vías asociadas con respuesta inmune son determinantes durante la CCC. Nuestro análisis, encontró tres vías canónicas asociadas a respuesta inmune dentro de las veinte primeras, entre estas: interacción entre las células dendríticas y linfocitos naturales (NK), fagocitosis mediada por el FcγR, y desarrollo de linfocitos B. Estas observaciones son consistentes con los resultados previos del análisis de interacción proteína-proteína (STRING) y revelan la importancia de la inflamación y la respuesta inmune como mecanismos claves para el desarrollo de la CCC.

5.3.1.2 Análisis de las principales funciones biológicas. Nuestro análisis integrado en IPA identificó las principales funciones biológicas afectadas a partir del conjunto de datos expresados de forma diferencial y significativa en la comparación CCC vs CNC y las más significativas fueron: circulación de células inmunes, desarrollo del sistema hematológico, desarrollo de piel y cabello, morfología del tejido y desarrollo del tejido conectivo. Estos resultados permiten establecer una conexión entre las alteraciones encontradas en los genes en la fase tardía de la CCC con las características histopatológicas de la enfermedad y señalan que la inflamación, respuesta inmune y el remodelamiento del tejido son mecanismos críticos para el desarrollo de la CCC.

5.3.1.3 Análisis de las principales redes de interacción molecular. El análisis de interacción muestra interacciones entre las moléculas del set de datos. Todas las redes fueron clasificadas de acuerdo al valor obtenido. De las 3 redes identificadas, seleccionamos las dos primeras dado que presentaron un puntaje mayor a 30.

La primera red involucró 35 moléculas entre proteínas y metabolitos y esta red presentó un puntaje de 46. Se pudo observar interconexión entre cerca de 10 proteínas (ACTG1, CORO1A, ANXA1, COTL1, F-ACTIN, ACTB, TAGLN2, PPIB, LDB3, y LCP1) las cuales hacen parte estructural del citoesqueleto. Las actinas β (ACTB), γ (ACTG1) son proteínas altamente conservadas y están involucradas en la movilidad, estructura e integridad celular. Las anexinas (ANXA1) juegan un papel importante en la respuesta inmune al regular la diferenciación y proliferación de las células T activadas y la inflamación, mientras la coactosina (COTL1) se une a los filamentos de actina y actúa como chaperona para la 5 lipooxigenasa. En conjunto, dichas proteínas se encuentran involucradas en diferentes procesos biológicos asociados a ensamble y organización del citoesqueleto, diferenciación de células, regulación de la polimerización del filamento de actina y síntesis de leucotrienos. Por lo tanto, la desregulación observada en nuestros resultados del conjunto de estas proteínas sugiere que durante la CCC ocurren alteraciones del citoesqueleto que pueden explicar el remodelado estructural observado en la lesión y la pérdida de la función cardíaca asociada a la progresión de la enfermedad.

Otro nodo observado en la red No 1 es el conformado por HLADRB1, BST1, MZB1, IGHM, IgG, IGG3, integrina. BST1 y MZB1, son proteínas que participan en la proliferación de las células B y la respuesta inmune humoral. La respuesta inflamatoria en el miocardio es un aspecto importante de la patogénesis de la CCC (Reis et al., 1993). Se sabe que durante la infección aguda *T. cruzi* infecta las células B humanas, sin embargo, el parásito menoscaba la respuesta

humoral mediante la inducción de apoptosis de células B inmaduras (Alves-Dos Santos et al., 2020). Por otra parte, la respuesta humoral observada durante la infección con *T.cruzi* evidencia una activación policlonal no específica de las células B (Acevedo et al., 2018). Lo anterior podría considerarse como dos estrategias del parásito para evadir la respuesta inmunitaria específica del hospedero. En nuestros resultados de interacción detectamos un nodo que involucró a algunos genes que codifican para la expansión de células B e inmunoglobulinas como sobreexpresados en el grupo con la enfermedad. Lo cual nos podría indicar que la respuesta inmune adaptativa de tipo humoral podría estar asociada a la patología. Sin embargo, esta respuesta humoral no es exitosa en el proceso de eliminación del parásito. Cabe mencionar, que una de las hipótesis más extendidas para explicar la patogénesis de la enfermedad de Chagas es la existencia de mecanismos inmunitarios autorreactivos desarrollados como consecuencia de la infección (Bonney et al., 2015). En particular, se han encontrado evidencias de mimetismo molecular entre las moléculas del huésped y del parásito, y se ha sugerido que esto puede llevar a la producción de anticuerpos autorreactivos con efectos deletéreos. Aunque es indiscutible que las respuestas autoinmunes están presentes en los pacientes con infección crónica por *T. cruzi*, sigue siendo controvertido si desempeñan un papel clave en su patogenia (García -Bustos et al., 2021).

Decorina (DCN), fibromodulina (FBLN2) y lumican (LUM), pertenecen a la familia de los proteoglicanos ricos en leucina (SLRP), los cuales se expresan en numerosos tejidos incluyendo el corazón y se encuentran dentro de la matriz extracelular. Ellos se unen al colágeno fibrilar y activan la fibrilógenesis (Christensen et al., 2019). En nuestro estudio, estas proteínas presentaron sobreexpresión y en la red No 1 se observaron interconectadas entre sí y con el colágeno. La expresión aumentada de estos genes demuestra su papel en el remodelamiento cardíaco. Este resultado fue confirmado mediante el análisis de LUM por western blot. Así mismo, se ha

reportado que la sobreexpresión de FBLN2 está asociada a enfermedad cardíaca (Argraves et al., 2003). Estudios previos han implicado algunos proteoglicanos en la regulación de la fibrosis. Los proteoglicanos han surgido en las últimas dos décadas como moléculas con importantes papeles en la remodelación de la matriz y la fibrosis en el corazón. Además, estudios recientes indican que los proteoglicanos son prometedores como biomarcadores de diagnóstico para la fibrosis cardíaca, y que pueden proporcionar nuevas estrategias terapéuticas para las enfermedades cardíacas (Wang et al., 2018).

Finalmente, nuestro análisis de interacción en IPA detectó interconexión entre L-carnitina y glutatión peroxidasa. Diversos estudios han demostrado efecto antioxidante de la L-carnitina en diferentes enfermedades, ya sea actuando como recolector (secuestrador) o mediante el incremento de la actividad de las enzimas antioxidantes. De hecho, un estudio realizado en un modelo murino de isquemia reperfusión (IR), encontró que la L-carnitina puede activar la vía de señalización Nrf2 y reducir el estrés oxidativo y la apoptosis en cardiomiocitos (Zhao et al., 2020). Además, un estudio reciente realizado en un modelo murino con infección por *T. cruzi* evidenció que algunos miembros de la familia de carnitina y la fosfatidilcolina se relacionaron con severidad de la CCC (McCall et al., 2017). Adicionalmente, en modelos de falla cardíaca, los metabolitos L-carnitina y acetil-L-carnitina mostraron asociación con resultados adversos de la insuficiencia cardíaca aguda (Israr et al., 2021). Sin embargo, se necesitan más estudios para investigar el papel y las implicaciones de los metabolitos de la carnitina en la patogenia de la CCC.

Finalmente, cabe señalar que en la red No 1 la mayoría de las interconexiones surgidas entre los componentes de la red convergieron en dos proteínas reguladoras: el complejo regulador de la fosfoinositol 3 quinasa (PI3K) y la quinasa reguladora de señales extracelulares (ERK 1/2).

Datos recientes sugieren la participación de NFκB, ASK-1 y ERK1/2 en la señalización del remodelamiento cardíaco (Santos et al., 2011).

De otra parte, **la red de interacción No 2** en IPA mostró conexión entre 29 proteínas y 3 metabolitos diferenciales en la comparación CCC vs CNC. Estas interacciones intermoleculares se relacionaron con respuesta celular al estrés oxidativo (SH3BGRL3, **SOD1**), procesos de diferenciación celular (HUWE1, S100A4), apoptosis (DAP) y procesos metabólicos relacionados con glucólisis (TKT), purinas (PAICS) y metabolismo del triptófano (**5-hidroxi-triptófano**). En esta red de interacción, se detectó un nodo de moléculas asociado a estrés oxidativo, el cual se caracterizó por la expresión muy disminuida de la enzima **SOD**. Este hallazgo es consistente con lo reportado por Gupta et al., quienes utilizando modelos experimentales de enfermedad de chagas en animales y humanos reportaron una disminución en la actividad de las enzimas antioxidantes glutatión peroxidasa (GPx) y SOD (Gupta et al., 2009). Un estudio metabólico previo, en el cual utilizando muestras de tejido y plasma de modelos murinos de infección aguda por *T. cruzi* encontraron desregulación en la captura de glucosa, en la producción de ROS y en el metabolismo del triptófano (Girones et al., 2014).

El análisis de interacción en IPA reveló 5 potenciales reguladores (AKT, NFκB, VEGF, ERK y P38). Estas moléculas, también son denominadas nodos debido al mayor número de interconexiones en la red. **AKT** es una proteína serina-treonina quinasa que regula cascadas de señalización celular. La vía PI3K-Akt-mTOR coordina la captación y utilización de múltiples nutrientes, como la glucosa, la glutamina, los nucleótidos y los lípidos y ha sido asociada con el crecimiento y la proliferación de las células cancerosas (Lien et al., 2016). Cabe señalar, que la hipertrofia cardíaca está mediada por el señalamiento de fosfatasa y quinasas de proteínas, como las MAPK, las quinasas Janus (JAK) y la vía PI3K/PDK/Akt (Karlstaedt et al., 2018). Estos datos

sugieren que las vías de señalización dependientes de AKT podrían estar implicadas en el crecimiento cardíaco patológico y están en línea con lo reportado por Chaanine AH et al., quienes demostraron que la activación a corto plazo de AKT promueve la hipertrofia fisiológica y la protección frente a la lesión miocárdica; en cambio, su activación a largo plazo provoca hipertrofia patológica e insuficiencia cardíaca (Chaanine et al., 2011).

Los miembros de la familia de la Jun N-terminal kinase (JNK) y de la p38 mitogen-activated protein kinase (MAPK) funcionan de manera específica para el contexto celular y el tipo de célula para integrar las señales que afectan a la proliferación, diferenciación, supervivencia y migración (Wagner, 2009). La fosforilación de **P38** ha sido descrita en modelos in vitro de infección por *T. cruzi* en fibroblastos cardíacos (Silva et al., 2019). Un estudio reciente mediante un análisis bioinformático del fosfoproteoma en un modelo de FC evidencia que **P38** podría estar implicado en la CCC (Wozniak et al., 2020).

Finalmente, **ERK** es un coactivador transcripcional y sus blancos son elementos del citoesqueleto, receptores de membrana y proteínas de unión. Dado que ERK es un mediador del tamaño y forma del cardiomiocito, esta quinasa cumple un papel en la regulación de la arquitectura celular. En ese sentido, en condiciones de estrés crónico la activación de ERK resulta en remodelamiento hipertrófico (Gilbert et al., 2021) y se ha asociado con progresión hacia la insuficiencia cardíaca (Gallo et al., 2019) Nuestros resultados son consistentes con lo evidenciado por Petkova y col, quienes reportaron que la infección por *T. cruzi* conduce a la activación de ERK (fosforilación) y endotelina -1 (Petkova et al., 2001). Sin embargo, el papel de la ERK en el proceso hipertrófico es controvertido y no se ha comprendido del todo.

En general, el análisis integrativo detectó las vías de señalización PI3K/AKT/mTOR, p38 y ERK como vías asociadas con la patología. Estos resultados son consistentes con la literatura,

dado que tras la activación de estas vías se activan factores de transcripción, que dan lugar a la reprogramación de la expresión génica cardíaca (Sugden y Clerk, 1998)

5.3.1.4 Análisis de los reguladores anteriores. En la comparación CCC vs CNC, el análisis de los reguladores anteriores en IPA señaló un estado de activación para tres reguladores (IL-5, IL-1 β y CCR2) con alta puntuación de confianza. Los reguladores detectados constituyen un marco de referencia para aclarar la dinámica entre los componentes y mecanismos subyacentes a las alteraciones patológicas de la CCC. El análisis muestra que los tres reguladores (IL-5, CCR2 e IL-1 β) ejercen su acción moduladora a través de la interacción con diferentes proteínas diana y como resultado de esta acción promueven el movimiento de las células mieloides, de los fagocitos y la proliferación de células del sistema linfático.

La IL-5 es producida principalmente por las células Th2 y mastocitos. Se sabe que esta citocina induce la diferenciación de linfocitos T y B, y que es una molécula esencial para activación, proliferación y supervivencia de los **eosinófilos**. Por otra parte, un hallazgo característico de las lesiones miocárdicas durante la CCC es la presencia de abundante infiltrado inflamatorio, constituido por varios tipos de células inflamatorias, incluyendo los eosinófilos. Molina y col, mediante análisis inmunohistoquímico de lesiones (ventrículo izquierdo) de pacientes con CCC establecieron una correlación entre la presencia de eosinófilos y la severidad de la miocarditis chagásica. Además, los mismos autores en un estudio posterior, identificaron depósitos de las principales proteínas catiónicas de los gránulos de los eosinófilos entre las fibras miocárdicas en las áreas necróticas de los casos crónicos, indicando degranulación y que estas células se encontraban activadas (Molina y Kierszenbaum, 1987). En nuestro análisis, la IL-5 fue identificada como un regulador activado de proteínas involucradas en la formación de la matriz

extracelular. La IL-5 induce en el eosinófilo la secreción de diversos factores como: TGF- β , proteína básica mayor, enzimas hidrolíticas y peroxidasas eosinofílicas, sin embargo, aún no se conoce completamente la asociación entre: infiltración de eosinófilos y depósito de proteínas de matriz extracelular. Un estudio realizado en un modelo experimental de fibrosis indicó claramente que las citocinas producidas por las células Th2 (IL-4, IL-5 e IL-13) contribuyeron a la fibrosis en algunos tejidos (Borthwick et al., 2013). Estudios previos realizados en modelos murinos han establecido una relación causal entre el aumento en la expresión de IL-4, con fibrosis y disfunción (Peng, et al., 2015). Nuestro ensayo de integración sugiere que la IL-5 podría estar involucrada en la regulación del remodelamiento y fibrosis a través de la degranulación de eosinófilos usando vías dependientes de TGF-B para inducir fibrosis cardíaca.

Nuestro análisis también identificó CCR2 e IL-1 β como reguladores que fueron detectados estar activos en la comparación CCC vs CNC. El receptor **CCR2** es expresado en los macrófagos y **la subpoblación de macrófagos que expresa (CCR2⁺)** se caracteriza por secretar altos niveles del mediador proinflamatorio IL-1 β en contraste, a los bajos niveles en la subpoblación CCR2⁻ (Lafuse et al., 2020). Un estudio previo, realizado en macrófagos aislados de explantes cardíacos de sujetos con falla cardíaca chagásica, mostró dos distintas subclases de macrófagos: CCR2⁻ y CCR2⁺ (Sanmarco, 2018). Otro estudio, mostró asociación entre la **abundancia de macrófagos CCR2⁺** y disfunción sistólica ventricular izquierda y remodelamiento adverso en sujetos con falla cardíaca (Bajpai et al., 2018). Cabe señalar, que un estudio previo realizado en nuestro grupo de investigación encontró variantes en los genes IL-1 β , CCR2 y CCR5, asociadas con severidad de la CCC (Machuca et al, 2014). Por otra parte, reportes recientes informan sobre la importancia de la activación del inflamósoma NLRP3 como un importante mecanismo en la patogénesis de la cardiomiopatía en humanos. El NLRP3 cuando es activado (ROS), induce la activación de la

enzima proteolítica caspasa-1. La caspasa-1 a su vez, regula la conversión de citocinas pro-IL-1 β a IL-1 β , lo cual conduce a una respuesta inflamatoria (Tong, et al., 2020). La IL-1 β es una citocina inflamatoria asociada con peor pronóstico en FC (Revuelta- López et al., 2020). Además, este mecanismo ha sido asociado a deterioro de varias enfermedades cardiovasculares tales como: arritmias, infarto de miocardio y fibrosis cardiaca (Zhou et al., 2021) por lo tanto, podría considerarse la IL-1 β como un nuevo blanco para la prevención y el tratamiento de las enfermedades cardiovasculares. En general, nuestros resultados sugieren que, tanto IL-5, IL-1 β como CCR2, serían moduladores de la respuesta inflamatoria, además de activar genes que juegan un papel crítico en la regulación de la matriz extracelular (DCN, LUM, ASP y VIM) y producción de mediadores inflamatorios secundarios como quimiocinas y ciclooxigenasas inductoras de prostaglandinas que sostienen la inflamación de forma prolongada.

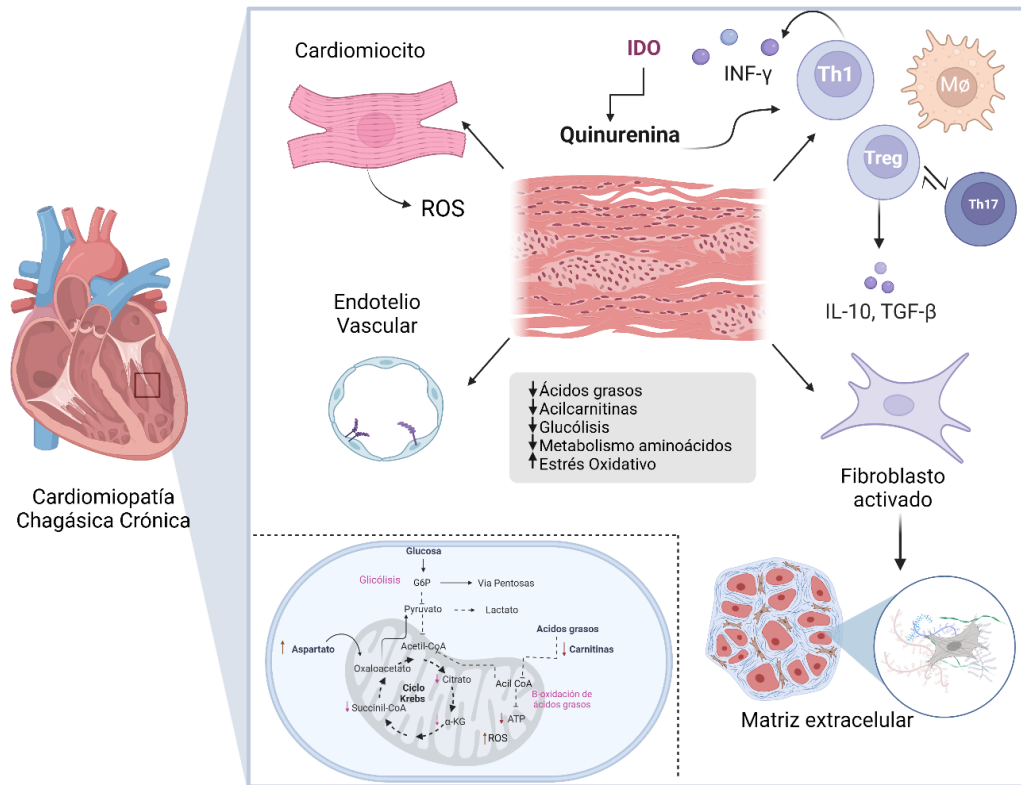
Propuesta de un modelo, con base en nuestros hallazgos nos permitimos plantear un modelo integrador de los mecanismos moleculares subyacentes a falla cardiaca durante la CCC. Este modelo involucra un conjunto de anomalías metabólicas y no metabólicas que señalizan e inciden en los componentes del estroma miocárdico, en el estado de las células inmunitarias (células T y macrófagos, entre otros) y por ende en el destino del tejido cardiaco. Señales proinflamatorias derivadas del infiltrado inflamatorio podría promover la degradación del triptófano a través de la vía de las quinureninas, ocasionando depleción del triptófano y un aumento en algunos metabolitos intermediarios de esta vía como la quinurenina. Este microambiente, aunado al déficit de energía y al estrés oxidativo presente en el cardiomiocito en esta etapa de la enfermedad resultaría en una *reprogramación metabólica (RM)* de las células inmunes como mecanismo adaptativo para sostener su función. Esta RM se realizaría a través de un proceso de señalización metabólica bidireccional entre el cardiomiocito, células del estroma y las células

inmunes. Esta adaptación conlleva cambios en el fenotipo efector de las células inmunes y resulta en disfunción del balance inmune, lo cual, a su vez conduciría a perpetuar el proceso inflamatorio, a activar aún más los procesos de fibrosis y remodelamiento cardíaco (Figura 47).

Este estudio evidencia una situación metabólica compleja en el miocardio chagásico, determinada por la deficiencia de sustratos energéticos y el desbalance en la respuesta inmune. Así mismo, los resultados apoyan la idea de una interacción entre metabolismo e inmunidad, dado que el metabolismo del cardiomiocito afecta al estado y destino de las células inmunitarias y contribuye así a la progresión y severidad de la CCC. Esta investigación amplía nuestra comprensión de los mecanismos moleculares subyacentes a la falla cardíaca durante la CCC, proporciona una comprensión integradora del inmunometabolismo que promete revelar nuevas formas de regulación biológica y representa una oportunidad para avanzar en la identificación de nuevos blancos para el desarrollo de tratamientos específicos para la enfermedad.

Figura 47.

Modelo integrador de los mecanismos moleculares subyacentes al desarrollo de la CCC.



Nota. La parte central de la figura corresponde al estroma miocárdico durante la fase tardía de la falla cardíaca secundaria a CCC. El estroma patológicamente alterado durante la CCC está constituido por áreas de tejido miocárdico aún conservadas y áreas con fibrosis, células de respuesta inmune (Infiltrado inflamatorio) y células no miocárdicas (células del endotelio vascular y fibroblastos). El daño o muerte del cardiomiocito producto del desbalance en los sustratos metabólicos y déficit de ATP, genera metabolitos y especies reactivas de oxígeno (ROS) que activan al endotelio y a las células inmunes a producir citocinas proinflamatorias (INF- γ). A su vez, esta citoquina podría activar la enzima IDO que induciría el catabolismo del triptófano a través de la vía de las quinureninas. Los niveles aumentados de quinurenina y el desbalance energético podrían inducir reprogramación metabólica en las células del infiltrado inflamatorio con el consecuente (Th17 a Treg) diferenciación y activación de nuevas funciones efectoras que favorecerían la activación de los fibroblastos, el depósito de fibrina y remodelamiento cardíaco.

6. Conclusiones

Este es el primer estudio que usa una estrategia ómica dual en miocardio humano con CCC para evaluar las alteraciones proteómicas y metabolómicas. Los resultados de este estudio evidenciaron alteraciones en los niveles de expresión de proteínas y metabolitos.

1. A nivel proteómico, las diferencias observadas en el miocardio con CCC frente a los controles con o sin cardiomiopatía permitieron identificar sobreexpresión de algunos genes candidatos: COTL1, LUM, CORO1A, ASPN y DCN. Adicionalmente, detectamos algunos metabolitos claves involucrados en la patofisiología de la enfermedad. Los metabolitos formil-quinurenina, quinurenina, NAD y 9,12,13, trihome se encontraron aumentados, mientras, 5 hidroxí-triptófano, triptofanoamida y L- carnitina fueron detectados muy disminuidos en el grupo CCC.

Los resultados obtenidos del análisis integrado de los datos proteómicos y metabolómicos, indicó que el ambiente patofisiológico detrás de la CCC comprende un espectro de alteraciones en la respuesta inflamatoria e inmune, en la reorganización del citoesqueleto, así como cambios en el metabolismo energético y en el sistema antioxidante, resultantes en fibrosis, remodelamiento adverso y disfunción contráctil.

Los procesos moleculares subyacentes a la progresión de la FC involucran reacciones inflamatorias e inmunológicas que incluyen, regulación del citoesqueleto de actina y alteraciones en la proliferación y diferenciación a través de la interacción con proteínas de matriz extracelular. Por lo tanto, nuestro análisis *in silico* sugiere que hay un alto grado de interconexión entre la respuesta inflamatoria y fibrótica.

2. Nuestros resultados metabólicos muestran una disminución en la concentración relativa de la mayoría de los metabolitos detectados (ácidos grasos, carnitinas, metabolitos del ciclo del ácido tricarboxílico, y del sistema antioxidante. La mayoría de los aminoácidos detectados con excepción del aspartato, se encontraron disminuidos, por lo que podríamos sugerir que durante la falla cardiaca de un paciente con CCC hay alteraciones en los substratos energéticos del cardiomiocito. Adicionalmente, se evidenció alteraciones en el metabolismo del triptofano a través de la vía de las quinureninas. Este hallazgo representa la primera vez que el metabolismo de las quinureninas ha sido relacionado como un mecanismo asociado a la severidad de la CCC.

3. De acuerdo con los niveles desregulados de los metabolitos detectados, podría sugerirse que hay alteraciones en algunos procesos metabólicos como la β -oxidación de los ácidos grasos y el metabolismo de la glucosa (Glicólisis y oxidación de la glucosa). Por lo tanto, basado en lo anterior, podría plantearse que existe un déficit de energía durante la fase tardía de la falla cardiaca en los pacientes con CCC.

4. Esta disminución en los procesos metabólicos como glicólisis y oxidación de la glucosa podrían conducir a esos cardiomiocitos a implementar nuevas vías como la gluconeogénesis lo cual podría resultar en un desacoplamiento metabólico que conduciría a un aumento en el lactato, sodio y calcio lo cual podría conducir a alteraciones en la contractilidad, signos característicos y muy frecuentes en los pacientes con CCC.

5. En general, nuestros resultados sugieren que, tanto IL-5, IL-1 β como CCR2, serían moduladores de la respuesta inflamatoria en CCC, y constituyen un vínculo con la generación de fibrosis ya que pueden participar en la regulación de la matriz extracelular y junto con la desregulación de la vía de señalización (Rho) probablemente constituyen nuevas opciones

terapéuticas para el desarrollo de tratamientos inmuno moduladores de los procesos fisiopatológicos involucrados con la progresión hacia falla cardiaca.

6. Los resultados obtenidos en este estudio nos permiten evidenciar que la fase tardía de la falla cardiaca durante la CCC se acompaña de alteraciones en mecanismos proinflamatorios, metabólicos e inmunes, concomitante con un aumento del estrés oxidativo y procesos de muerte celular.

Finalmente, este estudio ha evidenciado nuevos conocimientos sobre los posibles mecanismos moleculares asociados con la progresión de la cardiomiopatía chagásica. Sin embargo, se requiere una investigación más profunda de la conexión entre los mediadores inflamatorios, la degradación del triptófano y la CCC.

Referencias Bibliográficas

- Abel E.D. & Doenst T. (2011) Mitochondrial adaptations to physiological vs. pathological cardiac hypertrophy. *Cardiovasc Res.* May 1;90(2):234-42. doi: 10.1093/cvr/cvr015. Epub 2011 Jan 21. PMID: 21257612; PMCID: PMC3115280.
- Abel, L. C.; Rizzo, L. V.; Ianni, B.; Albuquerque, F.; Bacal, F., Carrara, D., ... & Cunha-Neto, E. (2001). Chronic Chagas' disease cardiomyopathy patients display an increased IFN- γ response to *Trypanosoma cruzi* infection. *Journal of autoimmunity*, 17(1), 99-107.
- Acevedo, G. R., Girard, M. C., & Gomez, K. A. (2018). The unsolved jigsaw puzzle of the immune response in Chagas disease. *Frontiers in immunology*, 1929.
- Acosta-Herrera, M., Strauss, M., Casares-Marfil, D., Martín, J., & Chagas Genetics CYTED Network (2019). Genomic medicine in Chagas disease. *Acta tropica*, 197, 105062. <https://doi.org/10.1016/j.actatropica.2019.105062>
- Adams, S., Braidy, N., Bessesde, A., Brew, B. J., Grant, R., Teo, C., & Guillemin, G. J. (2012). The kynurenine pathway in brain tumor pathogenesis. *Cancer research*, 72(22), 5649-5657.
- Aiello VD, de Campos FP. Chronic Chagas cardiomyopathy. *Autops Case Rep.* 2015 Sep 30;5(3):7-9. doi: 10.4322/acr.2015.012. PMID: 26558241; PMCID: PMC4636100.
- Alarcón de Noya, B.; Díaz-Bello, Z.; Colmenares, C.; Ruiz-Guevara, R.; Mauriello, L.; Zavala-Jaspe, R.; et al. (2010) Large urban outbreak of orally acquired acute Chagas disease at a school in Caracas, Venezuela. *J Infect Dis.* May 1;201(9):1308-15. doi: 10.1086/651608.

- Albareda, M. C.; Laucella, S. A.; Álvarez, M. G.; Armenti, A. H.; Bertochi, G.; Tarleton, R. L. & Postan, M. (2006). Trypanosoma cruzi modulates the profile of memory CD8+ T cells in chronic Chagas' disease patients. *International immunology*, 18(3), 465–471.
- Amieva, C. (2014). Chagas en la actualidad de Latinoamérica: viejos y nuevos problemas, grandes desafíos. *Aposta: Revista de ciencias sociales*, 62; 2014, 19-32.
- Añez, N.; Carrasco, H.; Parada, H.; Crisante, G.; Rojas, A.; Fuenmayor, C.; González, N.; Percoco, G.; Borges, R.; Guevara, P.; Ramírez, J. L. (1999) Myocardial parasite persistence in chronic chagasic patients. *Am J Trop Med Hyg.* May; 60(5):726-32. doi: 10.4269/ajtmh.1999.60.726. PMID: 10344642.
- Argraves, W. S.; Greene, L. M.; Cooley, M. A. & Gallagher, W. M. (2003). Fibulins: physiological and disease perspectives. *EMBO reports*, 4(12), 1127–1131. <https://doi.org/10.1038/sj.embor.7400033>
- Ahmed, Z. (2020). Practicing precision medicine with intelligently integrative clinical and multi-omics data analysis. *Hum Genomics* 14, 35 <https://doi.org/10.1186/s40246-020-00287-z>
- Bajpai, G.; Schneider, C.; Wong, N. *et al.* (2018) The human heart contains distinct macrophage subsets with divergent origins and functions. *Nat Med* 24, 1234–1245 <https://doi.org/10.1038/s41591-018-0059-x>
- Barona-Vilar, C.; Gimenez-Marti, M.J.; Fraile, T.; González-Steinbauer, C.; Parada, C.; Gil-Brusola, A. & Fernandez-Silveira, L. (2012). Prevalence of Trypanosoma cruzi infection in pregnant Latin American women and congenital transmission rate in a non-endemic area: the experience of the Valencian Health Programme (Spain). *Epidemiology & Infection*, 140(10), 1896-1903.

- Batista, A.M.; Alvarado-Arnez, L.E.; Alves, S.M.; Melo, G.; Pereira, I.R.; Ruivo, L.A.S.; Da Silva, A.A.; Gibaldi, D.; Da Silva, T.D.E.S.P.; De Lorena, V.M.B.; De Melo, A.S.; De Araújo Soares, A.K.; Barros, M.D.S.; Costa, V.M.A.; Cardoso, C.C.; Pacheco, A.G.; Carrazzone, C.; Oliveira, W. Jr.; Moraes, M.O. & Lannes-Vieira, J. (2018) Genetic Polymorphism at *CCL5* Is Associated With Protection in Chagas' Heart Disease: Antagonistic Participation of CCR1⁺ and CCR5⁺ Cells in Chronic Chagasic Cardiomyopathy. *Front Immunol.* Apr 11;9:615. doi: 10.3389/fimmu.2018.00615. PMID: 29696014; PMCID: PMC5904358.
- Behrends, M. & Engmann, O. (2020) Linker histone H1.5 is an underestimated factor in differentiation and carcinogenesis. *Environ Epigenet.* Oct 3;6(1): dvaa013. doi: 10.1093/eep/dvaa013. PMID: 33214908; PMCID: PMC7660118
- Bender A, Python A, Lindsay SW, Golding N, Moyes CL (2020) Modelling geospatial distributions of the triatomine vectors of *Trypanosoma cruzi* in Latin America. *PLoS Negl Trop Dis* 14(8): e0008411. <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0008411>.
- Benjamini, Y. & Hochberg, Y. (1995). Controlling the False Discovery Rate: A Practical and Powerful Approach to Multiple Testing. *Journal of the Royal Statistical Society: Series B (Methodological)*, 57: 289-300. <https://doi.org/10.1111/j.2517-6161.1995.tb02031.x>
- Bern, C.; Messenger, L.A.; Whitman, J.D.; Maguire, J.H. (2020). Chagas disease in the United States: a public health approach. *Clin Microbiol Rev* 33: e00023-19. <https://doi.org/10.1128/CMR.00023-19>.
- Besikci, A. O.; Campbell, F. M.; Hopkins, T. A.; Dyck, J. R. & Lopaschuk, G. D. (2003). Relative importance of malonyl CoA and carnitine in maturation of fatty acid oxidation in newborn

- rabbit heart. *American Journal of Physiology-Heart and Circulatory Physiology*, 284(1), H283-H289.
- Bestetti RB. (2016). Chagas Heart Failure in Patients from Latin America. *Card Fail Rev.* Nov;2(2):90-94. doi: 10.15420/cfr.2016:14:2. PMID: 28785459; PMCID: PMC5490952.
- Bierrenbach AL, Quintino ND, Moreira CHV, Damasceno RF, Nunes MdCP, Baldoni NR, et al. (2022) Hospitalizations due to gastrointestinal Chagas disease: National registry. *PLoS Negl Trop Dis* 16(9): e0010796. <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0010796>
- Bloksgaard, M.; Lindsey, M., & Martinez-Lemus, L. A. (2018). Extracellular matrix in cardiovascular pathophysiology. *American Journal of Physiology-Heart and Circulatory Physiology*, 315(6), H1687-H1690.
- Boja, E.S., Kinsinger, C.R., Rodriguez, H. *et al.* (2014). Integration of omics sciences to advance biology and medicine. *Clin Proteom* **11**, 45 <https://doi.org/10.1186/1559-0275-11-45>
- Bonney, K. M. & Engman, D. M. (2015). Autoimmune pathogenesis of Chagas heart disease: looking back, looking ahead. *The American journal of pathology*, 185(6), 1537-1547.
- Bonney KM, Luthringer DJ, Kim SA, Garg NJ, Engman DM. (2019). Pathology and Pathogenesis of Chagas Heart Disease. *Annu Rev Pathol.* Jan 24;14:421-447. doi: 10.1146/annurev-pathol-020117-043711. Epub 2018 Oct 24. PMID: 30355152; PMCID: PMC7373119.
- Borthwick, L.A.; Wynn, T.A & Fisher, A.J. (2013). Cytokine mediated tissue fibrosis *Biochim. Biophys. Acta*, 1832 (7), pp. 1049-1060
- Bostian, A. C. & Eoff, R. L. (2016). Aberrant kynurenine signaling modulates DNA replication stress factors and promotes genomic instability in gliomas. *Chemical research in toxicology*, 29(9), 1369-1380.

- Bozkurt, B.; Colvin, M.; Cook, J.; et al. (2016) “Current diagnostic and treatment strategies for specific dilated cardiomyopathies: a scientific statement from the American Heart Association,” *Circulation*, vol. 134, no. 23, pp. e579–e646.
- Brohée, S., & van Helden, J. (2006). Evaluation of clustering algorithms for protein-protein interaction networks. *BMC bioinformatics*, 7, 488. <https://doi.org/10.1186/1471-2105-7-488>
- Cai, C. W.; Blase, J. R.; Zhang, X.; Eickhoff, C. S. & Hoft, D. F. (2016). Th17 Cells Are More Protective Than Th1 Cells Against the Intracellular Parasite *Trypanosoma cruzi*. *PLoS pathogens*, 12(10), e1005902. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1005902>
- Cai, L.; Makhov, A. M. & Bear, J. E. (2007). F-actin binding is essential for coronin 1B function in vivo. *Journal of cell science*, 120(Pt 10), 1779–1790. <https://doi.org/10.1242/jcs.007641>
- Cai, Y. H.; Ma, Z. J.; Lu, X. Y.; He, E. L. & You, M. Y. (2016). Study on the effect and mechanism of the dysfunction of CD4(+) T cells in the disease process of chronic cardiac failure. *Asian Pacific journal of tropical medicine*, 9(7), 682–687. <https://doi.org/10.1016/j.apjtm.2016.05.006>
- Calderón-Celis, F., Encinar, J. R., & Sanz-Medel, A. (2018). Standardization approaches in absolute quantitative proteomics with mass spectrometry. *Mass spectrometry reviews*, 37(6), 715–737. <https://doi.org/10.1002/mas.21542>
- Caporizzo, M. A.; Chen, C. Y.; Bedi, K.; Margulies, K. B. & Prosser, B. L. (2020). Microtubules increase diastolic stiffness in failing human cardiomyocytes and myocardium. *Circulation*, 141(11), 902-915.
- Cardoso CS, Sabino EC, Oliveira CD, de Oliveira LC, Ferreira AM, Cunha-Neto E. (2016). Longitudinal study of patients with chronic Chagas cardiomyopathy in Brazil (SaMi-Trop

- project): a cohort profile. *BMJ Open*.;6(5):e011181. Epub 2016/05/06. doi: bmjopen-2016-011181 [pii] pmid:27147390; PubMed Central PMCID: PMC4861110cardoso
- Carniel, E.; Taylor, M. R.; Sinagra, G.; Di Lenarda, A.; Ku, L.; Fain, P. R.; ... & Mestroni, L. (2005). α -Myosin heavy chain: a sarcomeric gene associated with dilated and hypertrophic phenotypes of cardiomyopathy. *Circulation*, *112*(1), 54-59.
- Carrillo-Sanchez, S. C.; Martinez-Cruz, M.; Rodriguez-Morales, O. & Arce-Fonseca, M. (2016). Humoral Immune Response Against *Trypanosoma cruzi* Infection Using Plasmid DNA Immunotherapy in the Experimental Canine Model of Chagas Disease. *Circulation Research*, *119*(suppl_1), A230-A230.
- Castillo-Riquelme M. (2017) Chagas disease in non-endemic countries. *Lancet Glob Health*. Apr;5(4): e379-e380. doi: 10.1016/S2214-109X(17)30090-6. Epub 2017 Feb 28.
- Chaanine, A. H. & Hajjar, R. J. (2011). AKT signalling in the failing heart. *European journal of heart failure*, *13*(8), 825-829.
- Chan, K. T.; Creed, S. J. & Bear, J. E. (2011). Unraveling the enigma: progress towards understanding the coronin family of actin regulators. *Trends in cell biology*, *21*(8), 481-488.
- Chintapalli, S. V.; Jayanthi, S.; Mallipeddi, P. L.; Gundampati, R.; Kumar, T. K. S.; Van Rossum, D. B.; ... & Adams, S. H. (2016). Novel molecular interactions of acylcarnitines and fatty acids with myoglobin. *Journal of Biological Chemistry*, *291*(48), 25133-25143.
- Choi, H.; Fermin, D. & Nesvizhskii, A. I. (2008). Significance analysis of spectral count data in label-free shotgun proteomics. *Molecular & cellular proteomics*, *7*(12), 2373-2385.
- Choudhuri & Garj, N. (2020). *Trypanosoma cruzi* Induces the PARP1/AP-1 Pathway for Upregulation of Metalloproteinases and Transforming Growth Factor β in Macrophages:

- Role in Cardiac Fibroblast Differentiation and Fibrosis in Chagas Disease. *Host-Microbe Biology*. November/December Volume 11 Issue 6 e01853-20.
<https://doi.org/10.1128/mBio.01853-20>
- Christensen, G.; Herum, K. M. & Lunde, I. G. (2019). Sweet, yet underappreciated: proteoglycans and extracellular matrix remodeling in heart disease. *Matrix Biology*, 75, 286-299.
- Clayton J. (2010) The promise of T. cruzi genomics. *Nature*. Jun 24;465(7301): S16-7. doi: 10.1038/nature09225. PMID: 20571549.
- Cominacini, L.; Mozzini, C.; Garbin, U.; Pasini, A.; Stranieri, C.; Solani, E.; Vallerio, P.; Tinelli, I. A. & Fratta Pasini, A. (2015). Endoplasmic reticulum stress and Nrf2 signaling in cardiovascular diseases. *Free radical biology & medicine*, 88(Pt B), 233–242.
<https://doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2015.05.027>
- Cools, N.; Ponsaerts, P.; Van Tendeloo, V. F. & Berneman, Z. N. (2007). Regulatory T cells and human disease. *Clinical and Developmental Immunology*, 2007.
- Corey, A.B.; Sonetti, D.; Maloney, J.D.; Montgomery, S.P.; Rademacher, B.L.; Taylor, L.J. & Striker, R. (2017). Transmission of donor-derived Trypanosoma cruzi and subsequent development of Chagas disease in a lung transplant recipient. *Case reports in infectious diseases*.
- Coura, J.R. (2015). The main sceneries of Chagas disease transmission. The vectors, blood and oral transmissions - A comprehensive review. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, 110(3), 277-282. Epub December 02, 2014.<https://doi.org/10.1590/0074-0276140362>
- Cruzat, V.; Macedo Rogero, M.; Noel Keane, K.; Curi, R. & Newsholme, P. (2018). Glutamine: metabolism and immune function, supplementation and clinical translation. *Nutrients*, 10(11), 1564.

- Cunha-Neto, E. & Chevillard, C. (2014). Chagas disease cardiomyopathy: immunopathology and genetics. *Mediators of inflammation*.
- Cunha-Neto, E. & Chevillard, C. (2014). Chagas disease cardiomyopathy: immunopathology and genetics. *Mediators of inflammation*, 2014, 683230. <https://doi.org/10.1155/2014/683230>
- Da Costa, A.; Do Carmo Neto, J. R.; Braga, Y.; Silva, B. A.; Lamounier, A. B.; Silva, B. O.; Dos Reis, M. A.; De Oliveira, F. A.; Celes, M. & Machado, J. R. (2019). Cardiac Chagas Disease: MMPs, TIMPs, Galectins, and TGF- β as Tissue Remodelling Players. *Disease markers*, 2019, 3632906. <https://doi.org/10.1155/2019/3632906>
- De Araujo, F. F.; Vitelli-Avelar, D. M.; Teixeira-Carvalho, A.; Antas, P. R. Z.; Gomes, J. A. S., Sathler-Avelar, R.; ... & Martins-Filho, O. A. (2011). Regulatory T cells phenotype in different clinical forms of Chagas' disease. *PLoS Negl Trop Dis*, 5(5), e992.
- Deidda, M., Piras, C., Dessalvi, C. C., Locci, E., Barberini, L., Torri, F., Ascedu, F., Atzori, L., & Mercurio, G. (2015). Metabolomic approach to profile functional and metabolic changes in heart failure. *Journal of translational medicine*, 13, 297. <https://doi.org/10.1186/s12967-015-0661-3>
- De Jonge, J. J.; Batters, C.; O'Loughlin, T.; Arden, S. D. & Buss, F. (2019). The MYO 6 interactome: selective motor-cargo complexes for diverse cellular processes. *FEBS letters*, 593(13), 1494-1507.
- De Pablos Torró, L. M.; Retana Moreira, L. & Osuna, A. (2018). Extracellular vesicles in Chagas disease: a new passenger for an old disease. *Frontiers in microbiology*, 9, 1190.
- De Rosa, V.; Galgani, M.; Porcellini, A.; Colamatteo, A.; Santopaolo, M.; Zuchegna, C.; ... & Matarese, G. (2015). Glycolysis controls the induction of human regulatory T cells by

- modulating the expression of FOXP3 exon 2 splicing variants. *Nature immunology*, 16(11), 1174-1184.
- Dias, J. C., Ramos, A. N., Jr, Gontijo, E. D., Luquetti, A., Shikanai-Yasuda, M. A., Coura, J. R., Torres, R. M., Melo, J. R., Almeida, E. A., Oliveira, W., Jr, Silveira, A. C., Rezende, J. M., Pinto, F. S., Ferreira, A. W., Rassi, A., Fragata, A. A., Filho, Sousa, A. S., Correia, D., Jansen, A. M., Andrade, G. M., ... Alves, R. V. (2016). 2 nd Brazilian Consensus on Chagas Disease, 2015. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*, 49Suppl 1(Suppl 1), 3–60. <https://doi.org/10.1590/0037-8682-0505-2016>
- Dias J. C. (2000). Epidemiologia. pp. 48-74. En: *Trypanosoma cruzi e doença de Chagas*. Eds Brener Z., Andrade Z. & Barral-Netto M. Guanabara-Koogan, Rio de Janeiro, Brasil. días
- Díaz, M.L.; Leal, S.; Mantilla, J.C.; Molina-Berríos, A.; López-Muñoz, R.; Solari, A.; et al. (2015) Acute Chagas outbreaks: molecular and biological features of *Trypanosoma cruzi* isolates, and clinical aspects of acute cases in Santander, Colombia. *Parasit Vectors*. Nov 26; 8: 608. doi: 10.1186/s13071-015-1218-2. PMID: 26612724; PMCID: PMC4661967.
- Díaz, M.L. & González, C.I. (2014) Enfermedad de Chagas agudo: transmisión oral de *Trypanosoma cruzi* como una vía de transmisión re-emergente. *Rev. Univ. Ind. Santander salud*; 46(2): 177-188.
- Diedrich, J. K., Pinto, A. F., & Yates, J. R., 3rd (2013). Energy dependence of HCD on peptide fragmentation: stepped collisional energy finds the sweet spot. *Journal of the American Society for Mass Spectrometry*, 24(11), 1690–1699. <https://doi.org/10.1007/s13361-013-0709-7>

- Diehl, V., Huber, L. S., Trebicka, J., Wygrecka, M., Iozzo, R. V., & Schaefer, L. (2021). The Role of Decorin and Biglycan Signaling in Tumorigenesis. *Frontiers in oncology*, *11*, 801801. <https://doi.org/10.3389/fonc.2021.801801>
- Dirac-Svejstrup, A. B.; Sumizawa, T. & Pfeffer, S. R. (1997). Identification of a GDI displacement factor that releases endosomal Rab GTPases from Rab-GDI. *The EMBO journal*, *16*(3), 465-472.
- Dolivo, D. M.; Larson, S. A., & Dominko, T. (2018). Tryptophan metabolites kynurenine and serotonin regulate fibroblast activation and fibrosis. *Cellular and molecular life sciences : CMLS*, *75*(20), 3663–3681. <https://doi.org/10.1007/s00018-018-2880-2>
- Dos Santos, M. A.; Martins, F. A.; Borges, B. C.; De Gouveia Santos, J.; Alves, R. N.; Dias, M. H. ... & da Silva, C. V. (2020). Human B cells infected by Trypanosoma cruzi undergo F-actin disruption and cell death via caspase-7 activation and cleavage of phospholipase C γ 1. *Immunobiology*, *225*(3), 151904.
- Drake, K. J.; Sidorov, V. Y.; McGuinness, O. P.; Wasserman, D. H. & Wikswo, J. P. (2012). Amino acids as metabolic substrates during cardiac ischemia. *Experimental Biology and Medicine*, *237*(12), 1369-1378.
- Duran, C. & San Martín, A. (2014). Do endothelial cells eat tryptophan to die? *Circulation research*, *114*(3), 406-408.
- Engebretsen, K. V.; Lunde, I. G.; Strand, M. E.; Waehre, A.; Sjaastad, I.; Marstein, H. S., & Tønnessen, T. (2013). Lumican is increased in experimental and clinical heart failure, and its production by cardiac fibroblasts is induced by mechanical and proinflammatory stimuli. *The FEBS journal*, *280*(10), 2382-2398.

- Engman, D.M. & Leon, J.S. (2002) Pathogenesis of Chagas heart disease: role of autoimmunity. *Acta Trop.* Feb; 81(2):123-32. doi: 10.1016/s0001-706x(01)00202-9. PMID: 11801219.
- Esper, L.; Talvani, A.; Pimentel, P.; Teixeira, M.M. & Machado, F.S. (2015) Molecular mechanisms of myocarditis caused by *Trypanosoma cruzi*. *Curr Opin Infect Dis.* Jun;28(3):246-52. doi: 10.1097/QCO.000000000000157. PMID: 25887609.
- Evans, G (2000). Designer science and the “omic” revolution. *Nat Biotechnol* **18**, 127. <https://doi.org/10.1038/72480>
- Fallarino, F.; Grohmann, U.; You, S.; McGrath, B. C.; Cavener, D. R.; Vacca, C.; Orabona, C.; Bianchi, R.; Belladonna, M. L.; Volpi, C.; Santamaria, P.; Fioretti, MC. & Puccetti, P. (2006). The combined effects of tryptophan starvation and tryptophan catabolites down-regulate T cell receptor zeta-chain and induce a regulatory phenotype in naive T cells. *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)*, 176(11), 6752–6761.
- Fares, R. C.; Gomes, J.; Garzoni, L. R.; Waghabi, M. C.; Saraiva, R. M.; Medeiros, N. I.; Oliveira-Prado, R.; Sangenis, L. H.; Chambela, M.; De Araújo, F. F.; Teixeira-Carvalho, A.; Damásio, M. P.; Valente, V. A.; Ferreira, K. S.; Sousa, G. R.; Rocha, M. O. & Correa-Oliveira, R. (2013). Matrix metalloproteinases 2 and 9 are differentially expressed in patients with indeterminate and cardiac clinical forms of Chagas disease. *Infection and immunity*, 81(10), 3600–3608. <https://doi.org/10.1128/IAI.00153-13>
- Franco-Paredes, C.; et al. (2007) Chagas disease: an impediment in achieving the Millennium Development Goals in Latin America. *BMC international health and human rights*, vol. 7, no 1, p. 7.
- Frangogiannis, N. G. (2017). The extracellular matrix in myocardial injury, repair, and remodeling. *The Journal of clinical investigation*, 127(5), 1600-1612.

- Forsyth CJ, Manne-Goehler J, Bern C, Whitman J, Hochberg NS, Edwards M, Marcus R, Beatty NL, Castro-Sesquen YE, Coyle C, Stigler Granados P, Hamer D, Maguire JH, Gilman RH, Meymandi S. (2022) Recommendations for Screening and Diagnosis of Chagas Disease in the United States. *J Infect Dis.* 4;225(9):1601-1610. doi: 10.1093/infdis/jiab513. PMID: 34623435; PMCID: PMC9071346.
- Fu, S.; Zhang, Y.; Li, Y.; Luo, L.; Zhao, Y. & Yao, Y. (2020). Extracellular vesicles in cardiovascular diseases. *Cell death discovery*, 6(1), 1-9.
- Fuchs, D., Tang, X., Johnsson, A. K., Dahlén, S. E., Hamberg, M., & Wheelock, C. E. (2020). Eosinophils synthesize trihydroxyoctadecenoic acids (TriHOMEs) via a 15-lipoxygenase dependent process. *Biochimica et biophysica acta. Molecular and cell biology of lipids*, 1865(4), 158611. <https://doi.org/10.1016/j.bbalip.2020.158611>
- Fuenmayor, C.; Higuchi, M. L.; Carrasco, H.; Parada, H.; Gutierrez, P.; Aiello, V. & Palomino, S. (2005). Acute Chagas' disease: immunohistochemical characteristics of T cell infiltrate and its relationship with T. cruzi parasitic antigens. *Acta cardiologica*, 60(1), 33–37. <https://doi.org/10.2143/AC.60.1.2005046>
- Gallo, S.; Vitacolonna, A.; Bonzano, A.; Comoglio, P. & Crepaldi, T. (2019). ERK: A Key Player in the Pathophysiology of Cardiac Hypertrophy. *International journal of molecular sciences*, 20(9), 2164. <https://doi.org/10.3390/ijms20092164>
- Garcia, M.N.; Murphy, S.K.; Gross, A.; Wagner, J. & Murray, K.O. (2015) Knowledge, attitudes, and practices of Texas hunters: a potentially high-risk population for exposure to the parasite that causes Chagas disease. *Parasit Vectors.*; 8:197. Published Apr 1. doi:10.1186/s13071-015-0815-4

Garcia-Bustos, V.; Moral, P. M.; Cabañero-Navalon, M. D.; Lletí, M. S. & Muñoz, E. C. (2021).

Does Autoimmunity Play a Role in the Immunopathogenesis of Vasculitis Associated with Chronic Chagas Disease?. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*, 11.

Gáspár, R.; Halmi, D.; Demján, V.; Berkecz, R.; Pipicz, M. & Csont, T. (2022). Kynurenine

Pathway Metabolites as Potential Clinical Biomarkers in Coronary Artery Disease. *Mult. Implic. Kynurenine Pathw. Inflamm. Dis. Diagn. Ther. Appl*, 12.

Gasparim; Aretuza Zaupa et al. (2018) Epidemiological and clinical profile of patients with Chagas

disease in the Central-North area of Paraná, Southern Brazil. *Revista da Sociedade de Brasileira de Medicina Tropical*, vol. 51, no 2, p. 225-230.

Gazzinelli, R.T.; Hieny, S.; Wynn, T.A.; Wolf, S. & Sher, A. (1993). Interleukin 12 is required for

the T-lymphocyte-independent induction of interferon gamma by an intracellular parasite and induces resistance in T-cell-deficient hosts. *Proc Natl Acad Sci USA* 90: 6115-6119.

Gilbert, C.J.; Longenecker, J.Z. & Accornero, F. (2021) ERK1/2: An Integrator of Signals That

Alters Cardiac Homeostasis and Growth. *Biology (Basel)*. Apr 20;10(4):346. doi: 10.3390/biology10040346. PMID: 33923899; PMCID: PMC8072600.

Ginsburg, G. S., & Phillips, K. A. (2018). Precision Medicine: From Science To Value. *Health*

affairs (Project Hope), 37(5), 694–701. <https://doi.org/10.1377/hlthaff.2017.1624>

Giraldo, N.A.; Bolaños, N.I.; Cuellar, A.; et al. (2011) Increased CD4+/CD8+ double-positive T

cells in chronic Chagasic patients. *PLoS Negl Trop Dis.*; 5(8): e1294. doi: 10.1371/journal.pntd.0001294

Giraldo, N. A.; Bolaños, N. I.; Cuellar, A.; Roa, N.; Cucunubá, Z.; Rosas, F.; Velasco, V.; Puerta,

C. J. & González, J. M. (2013). T lymphocytes from chagasic patients are activated but

- lack proliferative capacity and down-regulate CD28 and CD3 ζ . *PLoS neglected tropical diseases*, 7(1), e2038. <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0002038>
- Gironès, N.; Rodríguez, C.I.; Carrasco-Marín, E.; Hernáez, R.F.; De Rego, J.L.; Fresno, M. (2001) (Savino, 2006). Dominant T- and B-cell epitopes in an autoantigen linked to Chagas' disease. *J Clin Invest.* Apr;107(8):985-93.
- Gironès, N.; Carbajosa, S.; Guerrero, N. A.; Poveda, C.; Chillón-Marinas, C. & Fresno, M. (2014). Global metabolomic profiling of acute myocarditis caused by *Trypanosoma cruzi* infection. *PLoS neglected tropical diseases*, 8(11), e3337. <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0003337>
- Gomes, J.A.; Bahia-Oliveira, L.M.; Rocha, M.O.; Martins-Filho, O.A.; Gazzinelli, G. & Correa-Oliveira, R. (2003) Evidence that Development of Severe Cardiomyopathy in Human Chagas' Disease Is Due to a Th1-Specific Immune Response. *Inf Immun.*; 71:1185–1193.
- González-Zambrano H, Amaya-Tapia G, Franco-Ramos MC, López León-Murguía OJ. (2020) Prevalence of Chagas heart disease in dilated cardiomyopathy. *Arch Cardiol Mex.* Oct 20;91(1):50-57. doi: 10.24875/ACM.20000042. PMID: 33079075; PMCID: PMC8258910.
- Goodacre, R.; Broadhurst, D.; Smilde, A.K. *et al.* (2007) Proposed minimum reporting standards for data analysis in metabolomics. *Metabolomics* **3**, 231–241 <https://doi.org/10.1007/s11306-007-0081-3>
- Grapov, D., Wanichthanarak, K., & Fiehn, O. (2015). MetaMapR: pathway independent metabolomic network analysis incorporating unknowns. *Bioinformatics (Oxford, England)*, 31(16), 2757–2760. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btv194>

- Gray, L. R.; Tompkins, S. C. & Taylor, E. B. (2014). Regulation of pyruvate metabolism and human disease. *Cellular and molecular life sciences*, 71(14), 2577-2604.
- Reis DD, Jones EM, Tostes S, Lopes ER, Chapadeiro E, Gazzinelli G, Colley DG, McCurley TL (1993) Expression of major histocompatibility complex antigens and adhesion molecules in hearts of patients with chronic Chagas' disease. *Am J Trop Med Hyg* 49:192–200
- Guarner J. (2019) Chagas disease as example of a reemerging parasite. *Semin Diagn Pathol*. May; 36(3):164-169. doi: 10.1053/j.semmdp.2019.04.008. Epub 2019 Apr 17.
- Guedes, P. M.; Gutierrez, F. R.; Silva, G. K.; Dellalibera-Joviliano, R.; Rodrigues, G. J.; Bendhack, L. M.; Rassi, A.; Jr, Rassi, A.; Schmidt, A.; Maciel, B. C.; Marin Neto, J. A. & Silva, J. S. (2012). Deficient regulatory T cell activity and low frequency of IL-17-producing T cells correlate with the extent of cardiomyopathy in human Chagas' disease. *PLoS neglected tropical diseases*, 6(4), e1630. <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0001630>
- Guertl, B.; Noehammer, C. & Hoefler, G. (2000). Metabolic cardiomyopathies. *International journal of experimental pathology*, 81(6), 349-372.
- Guhl, F.; Restrepo, M.; Angulo, V.M.; Antúnez, C.M.; Campbell-Lendrum, D. & Davies, C.R. (2005) Lessons from a national survey of Chagas disease transmission risk in Colombia. *Trends Parasitol*. Jun;21(6):259-62. doi: 10.1016/j.pt.2005.04.011. PMID: 15922243.
- Guhl, F. & Ramírez, J. D. (2021). Poverty, migration, and chagas disease. *Current Tropical Medicine Reports*, 8(1), 52-58.
- Guo, X., & Lankmayr, E. (2010). Multidimensional approaches in LC and MS for phospholipid bioanalysis. *Bioanalysis*, 2(6), 1109–1123. <https://doi.org/10.4155/bio.10.52>

- Gupta, S.; Wen, J. J. & Garg, N. J. (2009). Oxidative Stress in Chagas Disease. *Interdisciplinary perspectives on infectious diseases*, 2009, 190354. <https://doi.org/10.1155/2009/190354>
- Hasin, Y.; Seldin, M. & Lusis, A. (2017) Multi-omics approaches to disease. *Genome Biol.*, 18, p. 83, 10.1186/s13059-017-1215-1
- Hein, S.; Kostin, S.; Heling, A.; Maeno, Y. & Schaper, J. (2000). The role of the cytoskeleton in heart failure. *Cardiovascular research*, 45(2), 273-278.
- Hoffman, K.; Liu, Z.; Hossain, E.; Bottazzi, M.E.; Hotez, P.J.; Jones, K.M. & McCall, L. I. (2021). Alterations to the cardiac metabolome induced by chronic *T. cruzi* infection relate to the degree of cardiac pathology. *ACS Infectious Diseases*, 7(6), 1638-1649.
- Hoppel C. (2003). The role of carnitine in normal and altered fatty acid metabolism. *American journal of kidney diseases : the official journal of the National Kidney Foundation*, 41(4 Suppl 4), S4–S12. [https://doi.org/10.1016/s0272-6386\(03\)00112-4](https://doi.org/10.1016/s0272-6386(03)00112-4)
- Hossain, E.; Khanam, S.; Dean, D. A.; Wu, C.; Lostracco-Johnson, S.; Thomas, D. & McCall, L. I. (2020). Mapping of host-parasite-microbiome interactions reveals metabolic determinants of tropism and tolerance in Chagas disease. *Science advances*, 6(30), eaaz2015.
- Hossain, E.; Khanam, S.; Dean, D. A.; Wu, C.; Lostracco-Johnson, S.; Thomas, D.; Kane, S. S.; Parab, A. R.; Flores, K.; Katemauswa, M.; Gosmanov, C.; Hayes, S. E.; Zhang, Y.; Li, D.; Woelfel-Monsivais, C.; Sankaranarayanan, K. & L.-I., M. (2022). Mapping of host-parasite-microbiome interactions reveals metabolic determinants of tropism and tolerance in Chagas disease. *Science Advances*, 6(30), eaaz2015. <https://doi.org/10.1126/sciadv.aaz2015>

Hossain, E.; Khanam, S.; Dean, D. A.; Wu, C.; Lostracco-Johnson, S.; Thomas, D. & McCall, L.

I. (2020). Mapping of host-parasite-microbiome interactions reveals metabolic determinants of tropism and tolerance in Chagas disease. *Science advances*, 6(30), eaaz2015.

Idle, J. R., & Gonzalez, F. J. (2007). Metabolomics. *Cell metabolism*, 6(5), 348–351. <https://doi.org/10.1016/j.cmet.2007.10.005>

Iozzo, R. V., & Schaefer, L. (2015). Proteoglycan form and function: A comprehensive nomenclature of proteoglycans. *Matrix biology*, 42, 11-55.

Israr, M. Z., Bernieh, D., Salzano, A., Cassambai, S., Yazaki, Y., Heaney, L. M., Jones, D., Ng, L. L., & Suzuki, T. (2021). Association of gut-related metabolites with outcome in acute heart failure. *American heart journal*, 234, 71–80. <https://doi.org/10.1016/j.ahj.2021.01.006>

Iwai LK, Juliano MA, Juliano L, Kalil J, Cunha-Neto E. (2005) T-cell molecular mimicry in Chagas disease: identification and partial structural analysis of multiple cross-reactive epitopes between *Trypanosoma cruzi* B13 and cardiac myosin heavy chain. *J Autoimmun.* Mar;24(2):111-7. doi: 10.1016/j.jaut.2005.01.006. PMID: 15829403.

Kaarbø, M., Crane, D. I., & Murrell, W. G. (2003). RhoA is highly up-regulated in the process of early heart development of the chick and important for normal embryogenesis. *Developmental dynamics: an official publication of the American Association of Anatomists*, 227(1), 35-47.

Kaiser, H., Parker, E., & Hamrick, M. W. (2020). Kynurenine signaling through the aryl hydrocarbon receptor: Implications for aging and healthspan. *Experimental gerontology*, 130, 110797. <https://doi.org/10.1016/j.exger.2019.110797>

- Kalamajski, S., & Oldberg, Å. (2010). The role of small leucine-rich proteoglycans in collagen fibrillogenesis. *Matrix biology*, 29(4), 248-253.
- Kaliakatsos, M., Tzetis, M., Kanavakis, E., Fytili, P., Chouliaras, G., Karachalios, T., ... & Tsezou, A. (2006). Asporin and knee osteoarthritis in patients of Greek origin. *Osteoarthritis and cartilage*, 14(6), 609-611.
- Kanehisa, M., Goto, S., Sato, Y., Furumichi, M., & Tanabe, M. (2012). KEGG for integration and interpretation of large-scale molecular data sets. *Nucleic acids research*, 40(Database issue), D109–D114. <https://doi.org/10.1093/nar/gkr988>.
- Karamanos NK, Theocharis AD, Neill T & Iozzo RV (2019) Matrix modeling and remodeling: a biological interplay regulating tissue homeostasis and diseases. *Matrix Biol* 75–76, 1–11
- Karamanos, N. K., Theocharis, A. D., Neill, T., & Iozzo, R. V. (2019). Matrix modeling and remodeling: a biological interplay regulating tissue homeostasis and diseases. *Matrix Biology*, 75, 1-11.
- Karlstaedt, A., Schiffer, W., & Taegtmeyer, H. (2018). Actionable metabolic pathways in heart failure and cancer—lessons from cancer cell metabolism. *Frontiers in Cardiovascular Medicine*, 5, 71.
- Kaufers, A., Ellis, J., Stark, D. *et al.* (2017). The evolution of trypanosomatid taxonomy. *Parasites Vectors* **10**, 287 <https://doi.org/10.1186/s13071-017-2204-7>.
- Kauffmann A and Bromirski M, (2018). Selecting the best Q Exactive Orbitrap mass spectrometer scan mode for your application. Thermo scientific, Technical Note 65147.
- Kransdorf, E. P., Fishbein, M. C., Czer, L. S., Patel, J. K., Velleca, A., Tazelaar, H. D., Roy, R. R., Steidley, D. E., Kobashigawa, J. A., & Luthringer, D. J. (2016). Pathology of Chronic Chagas Cardiomyopathy in the United States: A Detailed Review of 13 Cardiectomy

- Cases. *American journal of clinical pathology*, 146(2), 191–198.
<https://doi.org/10.1093/ajcp/aqw098>
- Keesen, T. S., Gomes, J. A., Fares, R. C., de Araújo, F. F., Ferreira, K. S., Chaves, A. T., Rocha, M. O., & Correa-Oliveira, R. (2012). Characterization of CD4⁺ cytotoxic lymphocytes and apoptosis markers induced by *Trypanosoma cruzi* infection. *Scandinavian journal of immunology*, 76(3), 311–319. <https://doi.org/10.1111/j.1365-3083.2012.02730.x>
- Lafuse, W. P., Rajaram, M., Wu, Q., Moliva, J. I., Torrelles, J. B., Turner, J., & Schlesinger, L. S. (2019). Identification of an Increased Alveolar Macrophage Subpopulation in Old Mice That Displays Unique Inflammatory Characteristics and Is Permissive to *Mycobacterium tuberculosis* Infection. *Journal of immunology (Baltimore, Md.: 1950)*, 203(8), 2252–2264. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.1900495>
- Laucella, S. A., Riarte, A., Prado, N., Zapata, J., & Segura, E. L. (2001). $\alpha 4$ integrins and sialyl Lewis x modulation in chronic Chagas disease: further evidence of persistent immune activation. *Scandinavian journal of immunology*, 53(5), 514–519.
- Lavandero, S., Chiong, M., Rothermel, B. A., & Hill, J. A. (2015). Autophagy in cardiovascular biology. *The Journal of clinical investigation*, 125(1), 55–64.
<https://doi.org/10.1172/JCI73943>
- Leitinger B. (2014). Discoidin domain receptor functions in physiological and pathological conditions. *International review of cell and molecular biology*, 310, 39–87.
<https://doi.org/10.1016/B978-0-12-800180-6.00002-5>
- Lewis MD, Kelly JM. (2016) Putting Infection Dynamics at the Heart of Chagas Disease. *Trends Parasitol.* Nov;32(11):899-911. doi: 10.1016/j.pt.2016.08.009. Epub 2016 Sep 6.

- Li, X., Wang, W., & Chen, J. (2017). Recent progress in mass spectrometry proteomics for biomedical research. *Science China. Life sciences*, 60(10), 1093–1113. <https://doi.org/10.1007/s11427-017-9175-2>
- Li, L., Zhao, Q., & Kong, W. (2018). Extracellular matrix remodeling and cardiac fibrosis. *Matrix biology: journal of the International Society for Matrix Biology*, 68-69, 490–506. <https://doi.org/10.1016/j.matbio.2018.01.013>
- Lien, E. C., Lyssiotis, C. A., Juvekar, A., Hu, H., Asara, J. M., Cantley, L. C., & Toker, A. (2016). Glutathione biosynthesis is a metabolic vulnerability in PI (3) K/Akt-driven breast cancer. *Nature cell biology*, 18(5), 572-578.
- Liu, C. F., & Tang, W. (2019). Epigenetics in Cardiac Hypertrophy and Heart Failure. *JACC. Basic to translational science*, 4(8), 976–993. <https://doi.org/10.1016/j.jacbts.2019.05.011>
- Lopaschuk, G. D., Ussher, J. R., Folmes, C. D., Jaswal, J. S., & Stanley, W. C. (2010). Myocardial fatty acid metabolism in health and disease. *Physiological reviews*, 90(1), 207-258.
- Lund, A., Nordrehaug, J. E., Slettom, G., Hafstad Solvang, S. E., Ringdal Pedersen, E. K., Midttun, Ø., ... & Melvaer Giil, L. (2020). Plasma kynurenines and prognosis in patients with heart failure. *PLoS One*, 15(1), e0227365.
- Lynn, K. S., Cheng, M. L., Chen, Y. R., Hsu, C., Chen, A., Lih, T. M., Chang, H. Y., Huang, C. J., Shiao, M. S., Pan, W. H., Sung, T. Y., & Hsu, W. L. (2015). Metabolite identification for mass spectrometry-based metabolomics using multiple types of correlated ion information. *Analytical chemistry*, 87(4), 2143–2151. <https://doi.org/10.1021/ac503325c>
- Machuca, M. A., Suárez, E. U., Echeverría, L. E., Martín, J., & González, C. I. (2014). SNP/haplotype associations of CCR2 and CCR5 genes with severity of chagasic

- cardiomyopathy. *Human immunology*, 75(12), 1210–1215.
<https://doi.org/10.1016/j.humimm.2014.09.023>
- Malemud C. J. (2006). Matrix metalloproteinases (MMPs) in health and disease: an overview. *Frontiers in bioscience : a journal and virtual library*, 11, 1696–1701.
<https://doi.org/10.2741/1915>
- Mak M. (2020). Impact of crosslink heterogeneity on extracellular matrix mechanics and remodeling. *Computational and structural biotechnology journal*, 18, 3969–3976.
<https://doi.org/10.1016/j.csbj.2020.11.038>
- McDonough, J. L., Neverova, I., & Van Eyk, J. E. (2002). Proteomic analysis of human biopsy samples by single two-dimensional electrophoresis: Coomassie, silver, mass spectrometry, and Western blotting. *Proteomics*, 2(8), 978–987. <https://doi.org/10.1002/1615->
- Makrecka-Kuka, M., Sevostjanovs, E., Vilks, K., Volska, K., Antone, U., Kuka, J., & Liepinsh, E. (2017). Plasma acylcarnitine concentrations reflect the acylcarnitine profile in cardiac tissues. *Scientific reports*, 7(1), 1-11.
- Marin-Neto JA, Rassi A Jr. (2009) Update on Chagas heart disease on the first centenary of its discovery. *Rev Esp Cardiol*. Nov; 62(11):1211-6. doi: 10.1016/s1885-5857(09)73346-8. PMID: 19889330.
- Marin-Neto, J. A., Cunha-Neto, E., Maciel, B. C., & Simões, M. V. (2007). Pathogenesis of chronic Chagas heart disease. *Circulation*, 115(9), 1109-1123.
- Marino, A. P., Silva, A. A., Santos, P. V., Pinto, L. M., Gazinelli, R. T., Teixeira, M. M., & Lannes-Vieira, J. (2005). CC-chemokine receptors: a potential therapeutic target for *Trypanosoma cruzi*-elicited myocarditis. *Memorias do Instituto Oswaldo Cruz*, 100 Suppl 1, 93–96.
<https://doi.org/10.1590/s0074-02762005000900015>

- Matsuzaki, G., & Umemura, M. (2007). Interleukin-17 as an effector molecule of innate and acquired immunity against infections. *Microbiology and immunology*, *51*(12), 1139–1147. <https://doi.org/10.1111/j.1348-0421.2007.tb04008.x>
- Matzke, M. M., Brown, J. N., Gritsenko, M. A., Metz, T. O., Pounds, J. G., Rodland, K. D., Shukla, A. K., Smith, R. D., Waters, K. M., McDermott, J. E., & Webb-Robertson, B. J. (2013). A comparative analysis of computational approaches to relative protein quantification using peptide peak intensities in label-free LC-MS proteomics experiments. *Proteomics*, *13*(3-4), 493–503. <https://doi.org/10.1002/pmic.201200269>
- McCall, L. I., Morton, J. T., Bernatchez, J. A., de Siqueira-Neto, J. L., Knight, R., Dorrestein, P. C., & McKerrow, J. H. (2017). Mass spectrometry-based chemical cartography of a cardiac parasitic infection. *Analytical chemistry*, *89*(19), 10414-10421.
- Medeiros NI, Gomes JAS, Correa-Oliveira R. (2017) Synergic and antagonistic relationship between MMP-2 and MMP-9 with fibrosis and inflammation in Chagas' cardiomyopathy. *Parasite Immunol.* Aug;39(8). doi: 10.1111/pim.12446. Epub 2017 Jun 16. PMID: 28543409.
- Medzikovic, L., Aryan, L., Ruffenach, G., & Eghbali, M. (2020, July). Asporin Contributes to Reactive Interstitial Cardiac Fibrosis by Regulating Cardiac Fibroblast Activation. In *Circulation Research* (Vol. 127, No. Suppl_1, pp. A415-A415). Hagerstown, MD: Lippincott Williams & Wilkins.
- Melhem, N. J., Chajadine, M., Gomez, I., Howangyin, K. Y., Bouvet, M., Knosp, C., ... & Taleb, S. (2021). Endothelial cell indoleamine 2, 3-dioxygenase 1 alters cardiac function after myocardial infarction through kynurenine. *Circulation*, *143*(6), 566-580.

- Merline, R., Schaefer, R. M., & Schaefer, L. (2009). The matricellular functions of small leucine-rich proteoglycans (SLRPs). *Journal of cell communication and signaling*, 3(3), 323-335.
- Mezrich, J. D., Fechner, J. H., Zhang, X., Johnson, B. P., Burlingham, W. J., & Bradfield, C. A. (2010). An interaction between kynurenine and the aryl hydrocarbon receptor can generate regulatory T cells. *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)*, 185(6), 3190–3198.
- Mi, H., Muruganujan, A., Ebert, D., Huang, X., Thomas, P. D. (2019). PANTHER version 14: more genomes, a new PANTHER GO-slim and improvements in enrichment analysis tools. *Nucleic Acids Research*, 47(D1), 08D419–D426,
- Chailowsky, V., Luhrs, K., Rocha, M. O., Fouts, D., Gazzinelli, R. T., & Manning, J. E. (2003). Humoral and cellular immune responses to Trypanosoma cruzi-derived paraflagellar rod proteins in patients with Chagas' disease. *Infection and immunity*, 71(6), 3165–3171. <https://doi.org/10.1128/IAI.71.6.3165-3171.2003>
- Michalek, R. D., Gerriets, V. A., Jacobs, S. R., Macintyre, A. N., MacIver, N. J., Mason, E. F., ... & Rathmell, J. C. (2011). Cutting edge: distinct glycolytic and lipid oxidative metabolic programs are essential for effector and regulatory CD4+ T cell subsets. *The Journal of Immunology*, 186(6), 3299-3303.
- Monastyrskaya, K., Babiychuk, E. B., Hostettler, A., Wood, P., Grewal, T., & Draeger, A. (2009). Plasma membrane-associated annexin A6 reduces Ca²⁺ entry by stabilizing the cortical actin cytoskeleton. *Journal of biological chemistry*, 284(25), 17227-17242.
- Monje-Rumi MM, Florida-Yapur N, Zago MP, Ragone PG, Pérez Brandán CM, Nuñez S, Barrientos N, Tomasini N, Diosque P. (2020) Potential association of Trypanosoma cruzi DTUs TcV and TcVI with the digestive form of Chagas disease. *Infect Genet Evol.* Oct; 84:104329. doi: 10.1016/j.meegid.2020.104329. Epub 2020 Apr 24. PMID: 32339759.

- Mosharov, E., Cranford, M. R., & Banerjee, R. (2000). The quantitatively important relationship between homocysteine metabolism and glutathione synthesis by the transsulfuration pathway and its regulation by redox changes. *Biochemistry*, *39*(42), 13005–13011. <https://doi.org/10.1021/bi001088w>
- Mueller, P., Liu, X., & Pieters, J. (2011). Migration and homeostasis of naive T cells depends on coronin 1-mediated prosurvival signals and not on coronin 1-dependent filamentous actin modulation. *The Journal of Immunology*, *186*(7), 4039-4050.
- Mugnier, B., Nal, B., Verthuy, C., Boyer, C., Lam, D., Chasson, L., Nieoullon, V., Chazal, G., Guo, X. J., He, H. T., Rueff-Juy, D., Alcover, A., & Ferrier, P. (2008). Coronin-1A links cytoskeleton dynamics to TCR alpha beta-induced cell signaling. *PloS one*, *3*(10), e3467. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0003467>
- Munn, D. H., & Mellor, A. L. (2013). Indoleamine 2, 3 dioxygenase and metabolic control of immune responses. *Trends in immunology*, *34*(3), 137-143.
- Nandi, S.S., Mishra, P.K. (2017). H₂S and homocysteine control a novel feedback regulation of cystathionine beta synthase and cystathionine gamma lyase in cardiomyocytes. *Sci Rep* **7**, 3639 <https://doi.org/10.1038/s41598-017-03776-9>
- Nogueira, L. G., Santos, R. H., Fiorelli, A. I., Mairena, E. C., Benvenuti, L. A., Bocchi, E. A., Stolf, N. A., Kalil, J., & Cunha-Neto, E. (2014). Myocardial gene expression of T-bet, GATA-3, Ror- γ t, FoxP3, and hallmark cytokines in chronic Chagas disease cardiomyopathy: an essentially unopposed TH1-type response. *Mediators of inflammation*, *2014*, 914326. <https://doi.org/10.1155/2014/914326>

- Nie C, He T, Zhang W, Zhang G, Ma X. (2018) Branched Chain Amino Acids: Beyond Nutrition Metabolism. *International Journal of Molecular Sciences.*; 19(4):954. <https://doi.org/10.3390/ijms19040954>
- Nunes MCP, Beaton A, Acquatella H, Bern C, Bolger AF, Echeverría LE, Dutra WO, Gascon J, Morillo CA, Oliveira-Filho J, Ribeiro ALP, Marin-Neto JA; (2018) Chagas Cardiomyopathy: An Update of Current Clinical Knowledge and Management: A Scientific Statement from the American Heart Association. *Circulation*. Sep 18;138(12): e169-e209. doi: 10.1161/CIR.0000000000000599.
- Nunes MCP, Badano LP, Marin-Neto JA, Edvardsen T, Fernandez-Golfín C, Bucciarelli-Ducci C. (2018). Multimodality imaging evaluation of Chagas disease: an expert consensus of Brazilian Cardiovascular Imaging Department (DIC) and the European Association of Cardiovascular Imaging (EACVI) *Eur Heart J Cardiovasc Imaging*. :459–460.
- Nunes Mdo C, Beloti FR, Lima MM, Barbosa MM, Pinto Filho MM, de Barros MV, et al. (2010) Functional capacity and right ventricular function in patients with Chagas heart disease. *Eur J Echocardiogr*. Aug;11(7):590-5. doi: 10.1093/ejechocard/jeq022. Epub 2010 Mar 19. PMID: 20304840.
- Oliveira JSM, Araujo RRC, Navarro MA, Muccillo G (1983). Cardiac thrombosis and thromboembolism in chronic Chagas' heart disease. *Am J Cardiol.*;52(1):147- 51. [http://dx.doi.org/10.1016/0002-9149\(83\)90085-1](http://dx.doi.org/10.1016/0002-9149(83)90085-1). PMID:6858902.
- Olivera MJ, Fory JA, Porras JF, Buitrago G (2019) Prevalence of Chagas disease in Colombia: A systematic review and meta-analysis. *PLoS ONE* 14(1): e0210156. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0210156>.

- O'Neill, L. A., Kishton, R. J., & Rathmell, J. (2016). A guide to immunometabolism for immunologists. *Nature Reviews Immunology*, *16*(9), 553-565.
- Ota, T., Maeda, M., Okamoto, M., & Tatsuka, M. (2015). Positive regulation of Rho GTPase activity by RhoGDIs as a result of their direct interaction with GAPs. *BMC systems biology*, *9*(1), 1-9.
- Pallotta, M. T., Fallarino, F., Matino, D., Macchiarulo, A., & Orabona, C. (2014). AhR-mediated, non-genomic modulation of IDO1 function. *Frontiers in Immunology*, *5*, 497.
- Palomer X, Barroso E, Zarei M, Botteri G, Vázquez-Carrera M. (2016) PPAR β/δ and lipid metabolism in the heart. *Biochim Biophys Acta*. Oct;1861(10):1569-78. doi: 10.1016/j.bbali.2016.01.019. Epub 2016 Jan 26. PMID: 26825692.
- Pan American Health Organization. (2019) Guidelines for the diagnosis and treatment of Chagas disease. Washington, D.C.: PAHO. Available at: <http://iris.paho.org/xmlui/handle/10665.2/49653>
- Pandey HS, Kapoor R, Bindu, Seth P. (2022) Coronin 1A facilitates calcium mobilization and promotes astrocyte reactivity in HIV-1 neuropathogenesis. *FASEB Bioadvances*. Apr;4(4):254-272. DOI: 10.1096/fba.2021-00109. PMID: 35415462; PMCID: PMC8984076cai
- Papait, R, Serio S, and Condorelli G. (2020) Role of the Epigenome in Heart Failure. *Physiological Reviews* 100:4, 1753-1777
- Pavlopoulos, G. A., Malliarakis, D., Papanikolaou, N., Theodosiou, T., Enright, A. J., & Iliopoulos, I. (2015). Visualizing genome and systems biology: technologies, tools, implementation techniques and trends, past, present and future. *GigaScience*, *4*, 38. <https://doi.org/10.1186/s13742-015-0077-2>

- Peng, H., Sarwar, Z., Yang, X. P., Peterson, E. L., Xu, J., Janic, B., Rhaleb, N., Carretero, O. A., & Rhaleb, N. E. (2015). Profibrotic Role for Interleukin-4 in Cardiac Remodeling and Dysfunction. *Hypertension (Dallas, Tex.: 1979)*, *66*(3), 582–589. <https://doi.org/10.1161/HYPERTENSIONAHA.115.05627>
- Perl, A. (2015). mTOR activation is a biomarker and a central pathway to autoimmune disorders, cancer, obesity, and aging. *Annals of the new York Academy of Sciences*, *1346*(1), 33-44.
- Petkova SB, Huang H, Factor SM, Pestell RG, Bouzahzah B, Jelicks LA, Weiss LM, Douglas SA, Wittner M, Tanowitz HB (2001) The role of endothelin in the pathogenesis of Chagas' disease. *Int J Parasitol* 31:499–511
- Postani, M., M.R. Arnaiz & L.E. Fichera. (1999). Respuesta de las células cardiacas a la infección con *Trypanosoma cruzi*. *Medicina*. 59 (Suppl II): 57-62. (Salomone OA, 2003).
- Primavera, K. S., Umezawa, E. S., Peres, B. A., Camargo, M. E., & Hoshino-Shimizu, S. (1990). Chagas' disease: IgA, IgM and IgG antibodies to *T. cruzi* amastigote, trypomastigote and epimastigote antigens in acute and in different chronic forms of the disease. *Revista do Instituto de Medicina Tropical de Sao Paulo*, *32*(3), 172–180. <https://doi.org/10.1590/s0036-46651990000300005>
- Priyadharshini, B., Loschi, M., Newton, R. H., Zhang, J. W., Finn, K. K., Gerriets, V. A., ... & Turka, L. A. (2018). Cutting edge: TGF- β and phosphatidylinositol 3-kinase signals modulate distinct metabolism of regulatory T cell subsets. *The Journal of Immunology*, *201*(8), 2215-2219.
- Proietti, E., Rossini, S., Grohmann, U., & Mondanelli, G. (2020). Polyamines and kynurenines at the intersection of immune modulation. *Trends in immunology*, *41*(11), 1037-1050.

- Provost, P., Doucet, J., Hammarberg, T., Gerisch, G., Samuelsson, B., & Rådmark, O. (2001). 5-Lipoxygenase interacts with coactosin-like protein. *Journal of Biological Chemistry*, 276(19), 16520-16527.
- Raamsdonk, L. M., Teusink, B., Broadhurst, D., Zhang, N., Hayes, A., Walsh, M. C., Berden, J. A., Brindle, K. M., Kell, D. B., Rowland, J. J., Westerhoff, H. V., van Dam, K., & Oliver, S. G. (2001). A functional genomics strategy that uses metabolome data to reveal the phenotype of silent mutations. *Nature biotechnology*, 19(1), 45–50. <https://doi.org/10.1038/83496>
- Rakonjac, M., Fischer, L., Provost, P., Werz, O., Steinhilber, D., Samuelsson, B., & Rådmark, O. (2006). Coactosin-like protein supports 5-lipoxygenase enzyme activity and up-regulates leukotriene A4 production. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 103(35), 13150-13155.
- Reis, D. A., Jones, E. M., Tostes, S., Lopes, E. R., Chapadeiro, E., Gazzinelli, G., ... & McCurley, T. L. (1993). Expression of major histocompatibility complex antigens and adhesion molecules in hearts of patients with chronic Chagas' disease. *The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, 49(2), 192-200.
- Ren, W., Liu, G., Yin, J., Tan, B., Wu, G., Bazer, F. W., ... & Yin, Y. (2017). Amino-acid transporters in T-cell activation and differentiation. *Cell death & disease*, 8(3), e2655-e2655.
- Revuelta-López, E., Lupón, J., Lax, A., Pascual-Figal, D. A., & Bayés-Genís, A. (2020). Differences in the Interleukin-1 β /Soluble ST2 Interplay Between Acute and Chronic Heart Failure. *Journal of cardiovascular translational research*, 13(5), 864–866. <https://doi.org/10.1007/s12265-020-09958-7>

- Reyes, M, Torres, Á, Esteban, L, Flórez, M, and Angulo, V. M. (2017). Riesgo de transmisión de la enfermedad de Chagas por intrusión de triatomos y mamíferos silvestres en Bucaramanga, Santander, Colombia. *Biomédica*, 37(1), 68-78. <https://doi.org/10.7705/biomedica.v37i1.3051>
- Ribeiro AL, Nunes MP, Teixeira MM, Rocha MO. (2012) Diagnosis and management of Chagas disease and cardiomyopathy. *Nat Rev Cardiol*. Oct;9(10):576-89. doi: 10.1038/nrcardio.2012.109. Epub 2012 Jul 31. PMID: 22847166.
- Rozanova, S., Barkovits, K., Nikolov, M., Schmidt, C., Urlaub, H., Marcus, K. (2021). Quantitative Mass Spectrometry-Based Proteomics: An Overview. In: Marcus, K., Eisenacher, M., Sitek, B. (eds) *Quantitative Methods in Proteomics*. *Methods in Molecular Biology*, vol 2228. Humana, New York, NY. https://doi.org/10.1007/978-1-0716-1024-4_8
- Rutitzky, L. I., & Stadecker, M. J. (2006). CD4 T cells producing pro-inflammatory interleukin-17 mediate high pathology in schistosomiasis. *Memorias do Instituto Oswaldo Cruz*, 101 Suppl 1, 327–330. <https://doi.org/10.1590/s0074-02762006000900052>
- Sack, M. N., Rader, T. A., Park, S., Bastin, J., McCune, S. A., & Kelly, D. P. (1996). Fatty acid oxidation enzyme gene expression is downregulated in the failing heart. *Circulation*, 94(11), 2837-2842.
- Sah, V. P., Minamisawa, S., Tam, S. P., Wu, T. H., Dorn, G. W., Ross, J., ... & Brown, J. H. (1999). Cardiac-specific overexpression of RhoA results in sinus and atrioventricular nodal dysfunction and contractile failure. *The Journal of clinical investigation*, 103(12), 1627-1634.

- Salomone, O. A., Basquiera, A. L., Sembaj, A., Aguerri, A. M., Reyes, M. E., Omelianuk, M., Fernández, R. A., Enders, J., Palma, A., Barral, J. M., & Madoery, R. J. (2003). Trypanosoma cruzi in persons without serologic evidence of disease, Argentina. *Emerging infectious diseases*, 9(12), 1558–1562. <https://doi.org/10.3201/eid0912.030008>
- Samuel J, Oliveira M, Correa De Araujo RR, Navarro MA, Muccillo G (1983) Cardiac thrombosis and thromboembolism in chronic Chagas' heart disease. *Am J Cardio*.
- Sanmarco, L. M., Eberhardt, N., Bergero, G., Quebrada Palacio, L. P., Adami, P. M., Visconti, L. M., Minguéz, Á. R., Hernández-Vasquez, Y., Carrera Silva, E. A., Morelli, L., Postan, M., & Aoki, M. P. (2019). Monocyte glycolysis determines CD8+ T cell functionality in human Chagas disease. *JCI insight*, 4(18), e123490. <https://doi.org/10.1172/jci.insight.123490>
- Santacruz D, Rosas F, Hardy CA, Ospina D, Rosas AN, Camargo JM, Bermúdez JJ, et al. (2021). Advanced management of ventricular arrhythmias in chronic Chagas cardiomyopathy. *Heart Rhythm O2*, Vol 2(6); p:807-818. <https://doi.org/10.1016/j.hroo.2021.10.010>
- Santos, C. X., Anilkumar, N., Zhang, M., Brewer, A. C., & Shah, A. M. (2011). Redox signaling in cardiac myocytes. *Free radical biology & medicine*, 50(7), 777–793. <https://doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2011.01.003>
- Sarre, A., Gabrielli, J., Vial, G., Leverve, X. M., & Assimacopoulos-Jeannet, F. (2012). Reactive oxygen species are produced at low glucose and contribute to the activation of AMPK in insulin-secreting cells. *Free Radical Biology and Medicine*, 52(1), 142-150.
- Sathler-Avelar, R., Vitelli-Avelar, D. M., Teixeira-Carvalho, A., & Martins-Filho, O. A. (2009). Innate immunity and regulatory T-cells in human Chagas disease: what must be understood? *Memorias do Instituto Oswaldo Cruz*, 104, 246-251.

- Savino W, Guaraldi F (2017) Endocrine Immunology. *Front Horm Res. Basel, Karger*, vol 48, pp 160-175. doi: 10.1159/000452914
- Sayed-Ahmed, M. M., Alrufaiq, B. I., Alrikabi, A., Abdullah, M. L., Hafez, M. M., & Al-Shabanah, O. A. (2019). Carnitine supplementation attenuates sunitinib-induced inhibition of AMP-activated protein kinase downstream signals in cardiac tissues. *Cardiovascular toxicology*, 19(4), 344-356.
- Schechter, M. A., Hsieh, M. K., Njoroge, L. W., Thompson, J. W., Soderblom, E. J., Feger, B. J., ... & Bowles, D. E. (2014). Phosphoproteomic profiling of human myocardial tissues distinguishes ischemic from non-ischemic end stage heart failure. *PLoS One*, 9(8), e104157.
- Schwabl P, Imamura H, Van den Broeck F. et al. Meiotic sex in Chagas disease parasite *Trypanosoma cruzi*. *Nat Commun* 10, 3972 (2019). <https://doi.org/10.1038/s41467-019-11771-z>.
- Shannon, P., Markiel, A., Ozier, O., Baliga, N. S., Wang, J. T., Ramage, D., Amin, N., Schwikowski, B., & Ideker, T. (2003). Cytoscape: a software environment for integrated models of biomolecular interaction networks. *Genome research*, 13(11), 2498–2504. <https://doi.org/10.1101/gr.1239303>.
- Shen, J. X., Liu, G., & Zhao, Y. (2015). Strategies for improving sensitivity and selectivity for the quantitation of biotherapeutics in biological matrix using LC-MS/MS. *Expert Review of Proteomics*, 12(2), 125-131.
- Shen, W., Gao, C., Cueto, R., Liu, L., Fu, H., Shao, Y., Yang, W. Y., Fang, P., Choi, E. T., Wu, Q., Yang, X., & Wang, H. (2020). Homocysteine-methionine cycle is a metabolic sensor

- system controlling methylation-regulated pathological signaling. *Redox biology*, 28, 101322. <https://doi.org/10.1016/j.redox.2019.101322>
- Shimizu, T., & Liao, J. K. (2016). Rho kinases and cardiac remodeling. *Circulation Journal*, CJ-16.
- Silva, A. C., Pereira, C., Fonseca, A., Pinto-do-Ó, P., & Nascimento, D. S. (2021). Bearing My Heart: The Role of Extracellular Matrix on Cardiac Development, Homeostasis, and Injury Response. *Frontiers in cell and developmental biology*, 8, 621644. <https://doi.org/10.3389/fcell.2020.621644>
- Silva, L. H., Rodrigues, R. T., Assis, D. E., Benedeti, P. D., Duarte, M. S., & Chizzotti, M. L. (2019). Explaining meat quality of bulls and steers by differential proteome and phosphoproteome analysis of skeletal muscle. *Journal of proteomics*, 199, 51-66.
- Silverio, J. C., de-Oliveira-Pinto, L. M., da Silva, A. A., de Oliveira, G. M., & Lannes-Vieira, J. (2010). Perforin-expressing cytotoxic cells contribute to chronic cardiomyopathy in *Trypanosoma cruzi* infection. *International journal of experimental pathology*, 91(1), 72–86. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2613.2009.00670.x>
- Silverio, J. C., Pereira, I. R., Cipitelli, M., Vinagre, N. F., Rodrigues, M. M., Gazzinelli, R. T., & Lannes-Vieira, J. (2012). CD8+ T-cells expressing interferon gamma or perforin play antagonistic roles in heart injury in experimental *Trypanosoma cruzi*-elicited cardiomyopathy. *PLoS pathogens*, 8(4), e1002645. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1002645>
- Song, P., Ramprasath, T., Wang, H., & Zou, M. H. (2017). Abnormal kynurenine pathway of tryptophan catabolism in cardiovascular diseases. *Cellular and Molecular Life Sciences*, 74(16), 2899-2916.

- Stanley, W. C., Recchia, F. A., & Lopaschuk, G. D. (2005). Myocardial substrate metabolism in the normal and failing heart. *Physiological reviews*, 85(3), 1093-1129.
- Suárez C, Nolder D, García-Mingo A, Moore DAJ, Chiodini PL.(2022). Diagnosis and Clinical Management of Chagas Disease: An Increasing Challenge in Non-Endemic Areas. *Res Rep Trop Med*. Jul 22; 13:25-40. doi: 10.2147/RRTM.S278135. PMID: 35912165; PMCID: PMC9326036.
- Subramanian, I., Verma, S., Kumar, S., Jere, A., & Anamika, K. (2020). Multi-omics Data Integration, Interpretation, and Its Application. *Bioinformatics and biology insights*, 14, 1177932219899051. <https://doi.org/10.1177/1177932219899051>.
- Suleiman, M., Abdulrahman, N., Yalcin, H., & Mraiche, F. (2018). The role of CD44, hyaluronan and NHE1 in cardiac remodeling. *Life sciences*, 209, 197–201. <https://doi.org/10.1016/j.lfs.2018.08.009>
- Sun X, Alford J, Qiu H. (2021) Structural and Functional Remodeling of Mitochondria in Cardiac Diseases. *Int J Mol Sci*. Apr 17;22(8):4167. doi: 10.3390/ijms22084167. PMID: 33920673; PMCID: PMC8072869.
- Sun, J., & Tarleton, R. L. (1993). Predominance of CD8+ T lymphocytes in the inflammatory lesions of mice with acute *Trypanosoma cruzi* infection. *The American journal of tropical medicine and hygiene*, 48(2), 161–169. <https://doi.org/10.4269/ajtmh.1993.48.161>
- Tanowitz HB, Kaul DK, Chen B, Morris SA, Factor SM, Weiss LM, Wittner M. (1996) Compromised microcirculation in acute murine *Trypanosoma cruzi* infection. *J Parasitol*. Feb; 82(1):124-30. PMID: 8627481.
- Tarleton, R.L. (2001) Parasite persistence in the aetiology of Chagas disease. *Int J Parasitol*. May 1;31(5-6):550-4. doi: 10.1016/s0020-7519(01)00158-8. PMID: 11334941.

- Teixeira, A. R., Nitz, N., Guimaro, M. C., Gomes, C., & Santos-Buch, C. A. (2006). Chagas disease. *Postgraduate medical journal*, 82(974), 788–798. <https://doi.org/10.1136/pgmj.2006.047357>
- Teixeira, P. C., Iwai, L. K., Kuramoto, A. C., Honorato, R., Fiorelli, A., Stolf, N., Kalil, J., & Cunha-Neto, E. (2006). Proteomic inventory of myocardial proteins from patients with chronic Chagas' cardiomyopathy. *Brazilian journal of medical and biological research = Revista brasileira de pesquisas medicas e biologicas*, 39(12), 1549–1562. <https://doi.org/10.1590/s0100-879x2006001200005>
- Tokarz-Deptuła, B., Malinowska, M., Adamiak, M., & Deptuła, W. (2016). Coronins and their role in immunological phenomena. *Central-European Journal of Immunology*, 41(4), 435.
- Tong, Y., Wang, Z., Cai, L., Lin, L., Liu, J., & Cheng, J. (2020). NLRP3 Inflammasome and Its Central Role in the Cardiovascular Diseases. *Oxidative medicine and cellular longevity*, 2020, 4293206. <https://doi.org/10.1155/2020/4293206>
- Trygg, J., Holmes, E and Lundstedt T. (2007) Chemometrics in Metabonomics. *Journal of Proteome Research* 6 (2), 469-479DOI: 10.1021/pr060594q.
- Tyanova, S., Temu, T. & Cox, J. (2016). The MaxQuant computational platform for mass spectrometry-based shotgun proteomics. *Nat Protoc* 11, 2301–2319 <https://doi.org/10.1038/nprot.2016.136>
- Tyler, KM & Engman DM. (2001) The life cycle of *Trypanosoma cruzi* revisited. *International Journal for Parasitology*, Volume 31, Issues 5–6, Pages 472-481, ISSN 0020-7519, [https://doi.org/10.1016/S0020-7519\(01\)00153-9](https://doi.org/10.1016/S0020-7519(01)00153-9).

- Vafiadaki, E., Arvanitis, D. A., & Sanoudou, D. (2015). Muscle LIM Protein: Master regulator of cardiac and skeletal muscle functions. *Gene*, *566*(1), 1–7. <https://doi.org/10.1016/j.gene.2015.04.077>
- Van Weeghel, M., Abdurrachim, D., Nederlof, R., Argmann, C. A., Houtkooper, R. H., Hagen, J., ... & Houten, S. M. (2018). Increased cardiac fatty acid oxidation in a mouse model with decreased malonyl-CoA sensitivity of CPT1B. *Cardiovascular research*, *114*(10), 1324–1334.
- Verma, N., Pink, M., Boland, S. *et al.* (2017). Benzo[a]pyrene-induced metabolic shift from glycolysis to pentose phosphate pathway in the human bladder cancer cell line RT4. *Sci Rep* **7**, 9773 <https://doi.org/10.1038/s41598-017-09936-1>
- Viotti R, Vigliano C, Armenti A. (2006) A risk score for predicting death in Chagas' heart disease. *N Engl J Med*. Dec 7;355(23):2489; author reply 2490-1. PMID: 17152683.
- Vitelli-Avelar, D. M., Sathler-Avelar, R., Massara, R. L., Borges, J. D., Lage, P. S., Lana, M., Teixeira-Carvalho, A., Dias, J. C., Elói-Santos, S. M., & Martins-Filho, O. A. (2006). Are increased frequency of macrophage-like and natural killer (NK) cells, together with high levels of NKT and CD4+CD25high T cells balancing activated CD8+ T cells, the key to control Chagas' disease morbidity? *Clinical and experimental immunology*, *145*(1), 81–92. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2249.2006.03123>.
- Voltarelli, J. C., Donadi, E. A., Carvalho, I. F., & Falcão, R. P. (1990). Lymphocyte subpopulations and neutrophil function in chronic human Chagas' disease. *Revista do Instituto de Medicina Tropical de Sao Paulo*, *32*(4), 240–248. <https://doi.org/10.1590/s0036-46651990000400002>

- Waehre, A., Halvorsen, B., Yndestad, A., Husberg, C., Sjaastad, I., Nygård, S., ... & Christensen, G. (2011). Lack of chemokine signaling through CXCR5 causes increased mortality, ventricular dilatation and deranged matrix during cardiac pressure overload. *PLoS one*, 6(4), e18668.
- Wagner, E. F., & Nebreda, A. R. (2009). Signal integration by JNK and p38 MAPK pathways in cancer development. *Nature reviews. Cancer*, 9(8), 537–549.
<https://doi.org/10.1038/nrc2694>
- Wang, B., Wei, J., Meng, L., Wang, H., Qu, C., Chen, X., ... & Jiang, X. (2020). Advances in pathogenic mechanisms and management of radiation-induced fibrosis. *Biomedicine & Pharmacotherapy*, 121, 109560.
- Wang, H. B., Huang, R., Yang, K., Xu, M., Fan, D., Liu, M. X., ... & Tang, Q. Z. (2019). Identification of differentially expressed genes and preliminary validations in cardiac pathological remodeling induced by transverse aortic constriction. *International journal of molecular medicine*, 44(4), 1447-1461.
- Wang, Q.; Ding, Y., Song, P., Zhu, H., Okon, I., Ding, Y. N., ... & Zou, M. H. (2017). Tryptophan-Derived 3-Hydroxyanthranilic Acid Contributes to Angiotensin II-Induced Abdominal Aortic Aneurysm Formation in Mice In Vivo. *Circulation*, 136(23), 2271-2283.
- Wang, Q.; Zhang, M.; Ding, Y.; Wang, Q.; Zhang, W.; Song, P. & Zou, M. H. (2014). Activation of NAD(P)H oxidase by tryptophan-derived 3-hydroxykynurenine accelerates endothelial apoptosis and dysfunction in vivo. *Circulation research*, 114(3), 480–492.
<https://doi.org/10.1161/CIRCRESAHA.114.302113>
- Wang, X.; Yong, C.; Yu, K.; Yu, R.; Zhang, R.; Yu, L. & Cai, S. (2018). Long noncoding RNA (lncRNA) n379519 promotes cardiac fibrosis in post-infarct myocardium by targeting miR-

30. *Medical Science Monitor: International Medical Journal of Experimental and Clinical Research*, 24, 3958.
- Wang, X.; Zhu, X. X.; Jiao, S. Y.; Qi, D.; Yu, B. Q.; Xie, G. M. & Qu, A. J. (2022). Cardiomyocyte peroxisome proliferator-activated receptor α is essential for energy metabolism and extracellular matrix homeostasis during pressure overload-induced cardiac remodeling. *Acta Pharmacologica Sinica*, 43(5), 1231-1242.
- Want E. J. (2018). LC-MS Untargeted Analysis. *Methods in molecular biology (Clifton, N.J.)*, 1738, 99–116. https://doi.org/10.1007/978-1-4939-7643-0_7
- Wasinski, F.; Gregnani, M. F.; Ornellas, F. H.; Bacurau, A. V.; Câmara, N. O.; Araujo, R. C. & Bacurau, R. F. (2014). Lymphocyte glucose and glutamine metabolism as targets of the anti-inflammatory and immunomodulatory effects of exercise. *Mediators of inflammation*, 2014.
- Weaver, C. T. & Murphy, K. M. (2007). The central role of the Th17 lineage in regulating the inflammatory/autoimmune axis. *Seminars in immunology*, 19(6), 351–352. <https://doi.org/10.1016/j.smim.2008.01.001>
- Weiner, S., Sauer, M., Visser, P. J., Tijms, B. M., Vorontsov, E., Blennow, K., Zetterberg, H., & Gobom, J. (2022). Optimized sample preparation and data analysis for TMT proteomic analysis of cerebrospinal fluid applied to the identification of Alzheimer's disease biomarkers. *Clinical proteomics*, 19(1), 13. <https://doi.org/10.1186/s12014-022-09354-0>
- Wernisch, S., & Pennathur, S. (2016). Evaluation of coverage, retention patterns, and selectivity of seven liquid chromatographic methods for metabolomics. *Analytical and bioanalytical chemistry*, 408(22), 6079–6091. <https://doi.org/10.1007/s00216-016-9716-4>

- Wen, I.A.; Zago, M.P.; Nuñez, S.; Gupta S.; Nuñez- Burgos, F. & Garg N.J. (2012) Serum Proteomic Signature of Human Chagasic Patients for the Identification of Novel Potential Protein Biomarkers of Disease. *Molecular & Cellular Proteomics*, Volume 11, Issue 8.. Pages 435-452, ISSN 1535-9476. <https://doi.org/10.1074/mcp.M112.017640>.
- Weng Y, Zhang S, Huang W, Xie X, Ma Z, Fan Q.(2021). Efficacy of L-Carnitine for Dilated Cardiomyopathy: A Meta-Analysis of Randomized Controlled Trials. *Biomed Res Int*. Jan 12;2021:9491615. doi: 10.1155/2021/9491615. PMID: 33521132; PMCID: PMC7817303.
- Werneck GL (2022) The challenges for targeting Chagas disease for elimination as a public health problem. *Mem Inst Oswaldo Cruz*. May 16;117:e210033chgsa. doi: 10.1590/0074-02760210033chgsa. PMID: 35584509; PMCID: PMC9113728.
- West, J. A.; Beqqali, A.; Ament, Z.; Elliott, P.; Pinto, Y. M.; Arbustini, E.,& Griffin, J. L. (2016). A targeted metabolomics assay for cardiac metabolism and demonstration using a mouse model of dilated cardiomyopathy. *Metabolomics : Official journal of the Metabolomic Society*, 12, 59. <https://doi.org/10.1007/s11306-016-0956-2>
- Weston, L. A., Bauer, K. M., & Hummon, A. B. (2013). Comparison of bottom-up proteomic approaches for LC-MS analysis of complex proteomes. *Analytical methods : advancing methods and applications*, 5(18), 10.1039/C3AY40853A. <https://doi.org/10.1039/C3AY40853A>
- WHO (2015). Chagas disease in Latin America : an epidemiological update based on 2010 estimates. *Weekly Epidemiological Record*. 90 (06), 33-44.
- WHO (2021) [https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/chagas-disease-\(american-trypanosomiasis\)](https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/chagas-disease-(american-trypanosomiasis)).

- World Medical Association. (2013) *Declaration of Helsinki – Ethical principles for medical research involving human subjects*. Fortaleza: WMA.
- Wozniak, J. M.; Silva, T. A.; Thomas, D.; Siqueira-Neto, J. L.; McKerrow, J. H.; González, D. J., & Calvet, C. M. (2020). Molecular dissection of Chagas induced cardiomyopathy reveals central disease associated and druggable signaling pathways. *PLoS neglected tropical diseases*, *14*(5), e0007980. <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0007980>
- Wu, W. C.; Sun, H. W.; Chen, J.; OuYang, H. Y.; Yu, X. J.; Chen, H. T. & Zheng, L. (2019). Immunosuppressive immature myeloid cell generation is controlled by glutamine metabolism in human cancer. *Cancer immunology research*, *7*(10), 1605-1618.
- Xu, H.; Zhang, G. X.; Ciric, B. & Rostami, A. (2008). IDO: a double-edged sword for TH1/TH2 regulation. *Immunology letters*, *121*(1), 1-6.
- Yang, J. Z.; Zhang, J. Q. & Sun, L. X. (2016). Mechanisms for T cell tolerance induced with granulocyte colony-stimulating factor. *Molecular immunology*, *70*, 56-62.
- Yi, J. S.; Cox, M. A. & Zajac, A. J. (2010). T-cell exhaustion: characteristics, causes and conversion. *Immunology*, *129*(4), 474–481. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2567.2010.03255.x>
- Zago, M. P.; Wiktorowicz, J. E.; Spratt, H.; Koo, S. J.; Barrientos, N.; Nuñez Burgos, A.; Nuñez Burgos, J.; Iñiguez, F.; Botelli, V.; Leon de la Fuente, R. & Garg, N. J. (2019). Potential Utility of Protein Targets of Cysteine-S-Nitrosylation in Identifying Clinical Disease Status in Human Chagas Disease. *Frontiers in microbiology*, *9*, 3320. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2018.03320>.
- Zhang, F.; Fu, X.; Kataoka, M.; Liu, N.; Wang, Y.; Gao, F. & Chen, J. (2021). Long noncoding RNA Cfast regulates cardiac fibrosis. *Molecular Therapy-Nucleic Acids*, *23*, 377-392.

- Zhao, W.; Zhao, J. & Rong, J. (2020). Pharmacological Modulation of Cardiac Remodeling after Myocardial Infarction. *Oxidative medicine and cellular longevity*, 2020, 8815349. <https://doi.org/10.1155/2020/8815349>
- Zhou, J.; Zhou, Z.; Liu, X.; Yin, H. Y.; Tang, Y. & Cao, X. (2021). P2X7 Receptor-Mediated Inflammation in Cardiovascular Disease. *Frontiers in pharmacology*, 12, 654425. <https://doi.org/10.3389/fphar.2021.654425>
- Zingales, B.; Miles, M.A.; Campbell, D.A.; Tibayrenc, M.; Macedo, A.M.; Teixeira, M.M.; Schijman, A.G.; Llewellyn, M.S.; Lages-Silva E.; Machado, C.R.; Andrade, S.G. & Sturm, N.R. (2012) The revised *Trypanosoma cruzi* subspecific nomenclature: rationale, epidemiological relevance and research applications. *Infect Genet Evol.* Mar;12(2):240-53. Doi 10.1016/j.meegid.2011.12.009. Epub 2011 Dec 27.
- Zingales B, Bartholomeu DC. *Trypanosoma cruzi* genetic diversity: impact on transmission cycles and Chagas disease. *Mem Inst Oswaldo Cruz.* 2022 May 6;117:e210193. doi: 10.1590/0074-02760210193. PMID: 35544857; PMCID: PMC9088421

Apéndices

Apéndice A. Listado de estándares para metabolómica

Apéndice A1.

Peak Num	Compound Name	Formula	Polarity	Detected m/z	Delta (ppm)	Expected RT	Actual RT	Adduct1 H+
1	Melatonin	C13H16N2O2	+	233.12782	-2.71	4.7	4.39	14605654
2	Phenylhydrazine	C6H8N2	+	109.07604	0.16	5.2	4.85	207554
3	Nicotinate	C6H5NO2	+	124.0392	-0.85	6.6	7.36	5775970
4	Pyridoxine	C8H11NO3	+	170.0809	-1.57	7.9	7.6	16862102
5	riboflavin	C17H20N4O6	+	377.14484	-1.92	8.7	8	273342
6	Adenine	C5H5N5	+	136.0614	-2.72	9.7	9.1	12315417
7	Creatinine	C4H7N3O	+	114.06588	-2.71	10	9.35	13615360
8	L-Phenylalanine	C9H11NO2	+	166.08601	-1.45	10.3	9.61	2807353
9	L-Leucine	C6H13NO2	+	132.10197	0.52	10.9	10.12	1064938
10	4-Aminobenzoate	C7H7NO2	+	138.05478	-1.27	11.6	10.96	241298
11	Inosine	C10H12N4O5	+	269.0874	-2.39	10.9	10.39	458804
12	2-Phenylglycine	C8H9NO2	+	152.07051	-0.62	7.8	7.57	4278420
13	Selenomethionine	C5H11NO2Se	+	192.00868	-0.26	11.3	10.63	7799
14	L-Methionine	C5H11NO2S	+	150.05827	-0.35	11.4	10.73	1828408
15	Imidazole-4-acetate	C5H6N2O2	+	127.05006	-1.1	11	11.02	4069483
16	L-Tryptophan	C11H12N2O2	+	205.09666	-2.39	11.6	10.9	1101550
17	N-Acetyl-D-glucosamine	C8H15NO6	+	222.09673	-2.2	11.6	10.96	177321
18	Cytidine	C9H13N3O5	+	244.09229	-2.1	11.7	11.18	599867
19	Guanine	C5H5N5O	+	152.0565	-1.2	12.1	11.63	456373
20	L-Valine	C5H11NO2	+	118.08627	0.15	12.1	11.43	795361
21	L-Proline	C5H9NO2	+	116.0705	-0.88	12.3	11.63	4856877
22	sn-glycero-3-Phosphocholine	C8H20NO6P	+	258.10968	-1.63	13.2	12.41	9013790
23	L-Threonine	C4H9NO3	+	120.06564	0.97	13.3	12.8	175286
24	trans-4-Hydroxy-L-proline	C5H9NO3	+	132.06551	-0.1	13.3	12.74	1552365
25	N2-Acetyl-L-lysine	C8H16N2O3	+	189.12344	0.39	13.6	12.83	3446143
26	D-Glucosamine	C6H13NO5	+	180.08669	0.2	13.8	12.9	18432
27	L-Glutamine	C5H10N2O3	+	147.0762	-1.47	13.6	13.07	1282309
28	Taurine	C2H7NO3S	+	126.0219	-0.35	13.5	13.48	54322
29	L-Aspartate	C4H7NO4	+	134.04451	-2.05	13.2	13.07	26613
30	L-Asparagine	C4H8N2O3	+	133.0607	-0.52	13.8	13.28	56673
31	beta-Alanine	C3H7NO2	+	90.05492	-0.34	13.9	13.28	251797

Peak Num	Compound Name	Formula	Polarity	Detected m/z	Delta (ppm)	Expected RT	Actual RT	Adduct1 H+
32	Glycine	C2H5NO2	+	76.03932	0.22	14	13.59	6105
33	L-Serine	C3H7NO3	+	106.04989	0.18	14.1	13.73	40450
34	Ethanolamine phosphate	C2H8NO4P	+	142.02631	-0.45	13.7	13.28	10652
35	L-Citrulline	C6H13N3O3	+	176.10284	-0.7	14.1	13.55	887346
36	meso-2_6Diaminoheptanedioate	C7H14N2O4	+	191.10268	0.22	15.2	14.63	77076
37	L-Lysine	C6H14N2O2	+	147.11296	1.06	13.6	12.83	39450
38	Phenolsulfonphthalein	C19H14O5S	-	353.04965	2.08	4.9	5.7	1779369
39	Thymidine	C10H14N2O5	-	241.08347	1.95	7	6.57	164854
40	MOPS	C7H15NO4S	-	208.06546	2.68	6.4	7.07	717803
41	Deoxyuridine	C9H12N2O5	-	227.06778	1.91	8.2	7.88	83059
42	pyrazinoate	C5H4N2O2	-	123.0202	1.64	8.5	8.92	15729
43	(R)-3-Hydroxybutanoate	C4H8O3	-	103.04026	1.87	8.7	9.24	46341
44	3'_5'-Cyclic AMP	C10H12N5O6P	-	328.0462	2.93	9.1	9.15	7379
45	Uridine	C9H12N2O6	-	243.06273	1.93	10	9.59	84491
46	D-glucose	C6H12O6	-	179.05629	1	13.4	13.67	2736
47	Orotate	C5H4N2O4	-	155.0101	1.75	9.8	10.24	332646
48	Xanthine	C5H4N4O2	-	151.02634	1.24	11	11.07	8296
49	3_4-Dihydroxyphenylacetate	C8H8O4	-	167.03519	1.23	12.1	12.48	6839
50	Phthalate	C8H6O4	-	165.01935	0.1	12.4	12.79	840143
51	D-Gluconic acid	C6H12O7	-	195.05122	1.01	12.7	12.65	332839
52	UMP	C9H13N2O9P	-	323.02936	2.38	12.4	12.42	115983
53	L-Glutamate	C5H9NO4	-	146.04604	1.06	12.9	12.82	34015
54	Methylmalonate	C4H6O4	-	117.01943	0.86	13	13.22	145219
55	CMP	C9H14N3O8P	-	322.04529	2.22	13.1	13.05	82960
56	(R)-2-Hydroxyglutarate	C5H8O5	-	147.02998	0.59	13.1	13.33	313313
57	L-Cysteate	C3H7NO5S	-	167.99734	0.77	13.6	13.81	377288
58	D-ribose 5-phosphate	C5H11O8P	-	229.0121	0.97	13.4	13.36	24159
59	Malonate	C3H4O4	-	103.00381	1.29	13.5	13.74	122287
60	D-Galacturonate	C6H10O7	-	193.03534	-0.19	14.1	14.02	42880
61	Fumarate	C4H4O4	-	115.00365	-0.3	13.6	14.02	20677
62	D-glucose 6-phosphate	C6H13O9P	-	259.02271	1.02	13	13.95	15256
63	D-Galactarate	C6H10O8	-	209.02995	-1.61	14	14.51	40518
64	Phosphoenolpyruvate	C3H5O6P	-	166.97514	0.27	14.3	14.58	120261
65	cis-Aconitate	C6H6O6	-	173.00897	-1.09	14.5	14.96	157740
66	D-Erythrose	C4H8O4	-	119.03515	1.4	11.6	10.98	3519
67	Maltose	C12H22O11	-	341.1098	2.54	14.3	13.64	4707
68	2-oxobutanoate	C4H6O3	-	101.02458	1.63	6.1	6.6	94861
69	2-Methylcitrate	C7H10O7	-	205.0352	-0.85	14.3	14.51	321319
70	3-Hydroxyphenylacetate	C8H8O3	-	151.04036	1.93	8.3	9.21	28799

Apéndice A2.

Peak Num	Compound Name	Formula	Polarity	Detected m/z	Delta (ppm)	Expected RT	Actual RT	Adduct1 H+
1	Melatonin	C13H16N2O2	+	233.12782	-2.71	4.7	4.39	14605654
2	Phenylhydrazine	C6H8N2	+	109.07604	0.16	5.2	4.85	207554
3	Nicotinate	C6H5NO2	+	124.0392	-0.85	6.6	7.36	5775970
4	Pyridoxine	C8H11NO3	+	170.0809	-1.57	7.9	7.6	16862102
5	riboflavin	C17H20N4O6	+	377.14484	-1.92	8.7	8	273342
6	Adenine	C5H5N5	+	136.0614	-2.72	9.7	9.1	12315417
7	Creatinine	C4H7N3O	+	114.06588	-2.71	10	9.35	13615360
8	L-Phenylalanine	C9H11NO2	+	166.08601	-1.45	10.3	9.61	2807353
9	L-Leucine	C6H13NO2	+	132.10197	0.52	10.9	10.12	1064938
10	4-Aminobenzoate	C7H7NO2	+	138.05478	-1.27	11.6	10.96	241298
11	Inosine	C10H12N4O5	+	269.0874	-2.39	10.9	10.39	458804
12	2-Phenylglycine	C8H9NO2	+	152.07051	-0.62	7.8	7.57	4278420
13	Selenomethionine	C5H11NO2Se	+	192.00868	-0.26	11.3	10.63	7799
14	L-Methionine	C5H11NO2S	+	150.05827	-0.35	11.4	10.73	1828408
15	Imidazole-4-acetate	C5H6N2O2	+	127.05006	-1.1	11	11.02	4069483
16	L-Tryptophan	C11H12N2O2	+	205.09666	-2.39	11.6	10.9	1101550
17	N-Acetyl-D-glucosamine	C8H15NO6	+	222.09673	-2.2	11.6	10.96	177321
18	Cytidine	C9H13N3O5	+	244.09229	-2.1	11.7	11.18	599867
19	Guanine	C5H5N5O	+	152.0565	-1.2	12.1	11.63	456373
20	L-Valine	C5H11NO2	+	118.08627	0.15	12.1	11.43	795361
21	L-Proline	C5H9NO2	+	116.0705	-0.88	12.3	11.63	4856877
22	sn-glycero-3-Phosphocholine	C8H20NO6P	+	258.10968	-1.63	13.2	12.41	9013790
23	L-Threonine	C4H9NO3	+	120.06564	0.97	13.3	12.8	175286
24	trans-4-Hydroxy-L-proline	C5H9NO3	+	132.06551	-0.1	13.3	12.74	1552365
25	N2-Acetyl-L-lysine	C8H16N2O3	+	189.12344	0.39	13.6	12.83	3446143
26	D-Glucosamine	C6H13NO5	+	180.08669	0.2	13.8	12.9	18432
27	L-Glutamine	C5H10N2O3	+	147.0762	-1.47	13.6	13.07	1282309
28	Taurine	C2H7NO3S	+	126.0219	-0.35	13.5	13.48	54322
29	L-Aspartate	C4H7NO4	+	134.04451	-2.05	13.2	13.07	26613
30	L-Asparagine	C4H8N2O3	+	133.0607	-0.52	13.8	13.28	56673
31	beta-Alanine	C3H7NO2	+	90.05492	-0.34	13.9	13.28	251797
32	Glycine	C2H5NO2	+	76.03932	0.22	14	13.59	6105
33	L-Serine	C3H7NO3	+	106.04989	0.18	14.1	13.73	40450
34	Ethanolamine phosphate	C2H8NO4P	+	142.02631	-0.45	13.7	13.28	10652
35	L-Citrulline	C6H13N3O3	+	176.10284	-0.7	14.1	13.55	887346
36	meso-2_6-Diaminoheptanedioate	C7H14N2O4	+	191.10268	0.22	15.2	14.63	77076
37	L-Lysine	C6H14N2O2	+	147.11296	1.06	13.6	12.83	39450
38	L-Arginine	C6H14N4O2	+	175.11891	-0.23	22.3	20.91	253897
39	Phenolsulfonphthalein	C19H14O5S	-	353.04965	2.08	4.9	5.7	1779369
40	Thymidine	C10H14N2O5	-	241.08347	1.95	7	6.57	164854
41	MOPS	C7H15NO4S	-	208.06546	2.68	6.4	7.07	717803

Peak Num	Compound Name	Formula	Polarity	Detected m/z	Delta (ppm)	Expected RT	Actual RT	Adduct1 H+
42	Pyruvate	C3H4O3	-	87.00889	1.39	7.2	8.4	31429
43	Deoxyuridine	C9H12N2O5	-	227.06778	1.91	8.2	7.88	83059
44	4-Coumarate	C9H8O3	-	163.04036	1.79	7.2	8.33	346056
45	pyrazinoate	C5H4N2O2	-	123.0202	1.64	8.5	8.92	15729
46	(R)-3-Hydroxybutanoate	C4H8O3	-	103.04026	1.87	8.7	9.24	46341
47	3'_5'-Cyclic AMP	C10H12N5O6P	-	328.0462	2.93	9.1	9.15	7379
48	Uridine	C9H12N2O6	-	243.06273	1.93	10	9.59	84491
49	D-glucose	C6H12O6	-	179.05629	1	13.4	13.67	2736
50	Orotate	C5H4N2O4	-	155.0101	1.75	9.8	10.24	332646
51	Xanthine	C5H4N4O2	-	151.02634	1.24	11	11.07	8296
52	3_4-Dihydroxyphenylacetate	C8H8O4	-	167.03519	1.23	12.1	12.48	6839
53	Phthalate	C8H6O4	-	165.01935	0.1	12.4	12.79	840143
54	D-Gluconic acid	C6H12O7	-	195.05122	1.01	12.7	12.65	332839
55	UMP	C9H13N2O9P	-	323.02936	2.38	12.4	12.42	115983
56	L-Glutamate	C5H9NO4	-	146.04604	1.06	12.9	12.82	34015
57	Methylmalonate	C4H6O4	-	117.01943	0.86	13	13.22	145219
58	CMP	C9H14N3O8P	-	322.04529	2.22	13.1	13.05	82960
59	(R)-2-Hydroxyglutarate	C5H8O5	-	147.02998	0.59	13.1	13.33	313313
60	L-Cysteate	C3H7NO5S	-	167.99734	0.77	13.6	13.81	377288
61	D-ribose 5-phosphate	C5H11O8P	-	229.0121	0.97	13.4	13.36	24159
62	Malonate	C3H4O4	-	103.00381	1.29	13.5	13.74	122287
63	D-Galacturonate	C6H10O7	-	193.03534	-0.19	14.1	14.02	42880
64	Fumarate	C4H4O4	-	115.00365	-0.3	13.6	14.02	20677
65	D-glucose 6-phosphate	C6H13O9P	-	259.02271	1.02	13	13.95	15256
66	D-Galactarate	C6H10O8	-	209.02995	-1.61	14	14.51	40518
67	Phosphoenolpyruvate	C3H5O6P	-	166.97514	0.27	14.3	14.58	120261
68	cis-Aconitate	C6H6O6	-	173.00897	-1.09	14.5	14.96	157740
69	D-Erythrose	C4H8O4	-	119.03515	1.4	11.6	10.98	3519
70	Maltose	C12H22O11	-	341.1098	2.54	14.3	13.64	4707
71	2-oxobutanoate	C4H6O3	-	101.02458	1.63	6.1	6.6	94861
72	2-Methylcitrate	C7H10O7	-	205.0352	-0.85	14.3	14.51	321319
73	3-Hydroxyphenylacetate	C8H8O3	-	151.04036	1.93	8.3	9.21	28799

Apéndice A3.

Peak Num	Compound Name	Formula	Polarity	Detected m/z	Delta (ppm)	Expected RT	Actual RT	Adduct1 H+
1	Thiopurine S-methylether	C6H6N4S	+	167.03848	-0.66	6.39	5.94	3994723
2	Nicotinamide	C6H6N2O	+	123.05518	-0.86	9.4	9.11	17748
3	Pyridoxal	C8H9NO3	+	168.06546	-0.35	14.32	13.41	2840
4	6-Methylaminopurine	C6H7N5	+	150.07729	-0.91	13.14	12.64	2579
5	Picolinic acid	C6H5NO2	+	124.03922	-0.72	8.03	8.63	552002
6	thymine	C5H6N2O2	+	127.05021	0.04	7.18	7.04	176831
7	Hypoxanthine	C5H4N4O	+	137.04572	-0.53	9.4	9.84	694656
8	Betaine	C5H11NO2	+	118.08602	-1.98	13.39	12.61	4452
9	cytosine	C4H5N3O	+	112.05049	-0.42	15.42	14.66	2055

Peak Num	Compound Name	Formula	Polarity	Detected m/z	Delta (ppm)	Expected RT	Actual RT	Adduct1 H+
10	L-isoleucine	C6H13NO2	+	132.10179	-0.86	12.58	12.49	4917
11	Ala-Gly	C5H10N2O3	+	147.07625	-1.16	9.69	10.16	162592
12	Guanosine	C10H13N5O5	+	284.09821	-2.6	11.13	11.56	12617
13	1-Aminocyclopropane-1carboxylate	C4H7NO2	+	102.05492	-0.38	14.59	13.9	1367
14	AMP	C10H14N5O7P	+	348.06958	-2.24	12.56	11.86	393271
15	NAD+	C21H27N7O14P2	+	664.11548	-1.38	11.41	11.92	46419
16	Phenol	C6H6O	+	95.04906	-0.81	5.71	5.77	2012
17	L-2-Amino adipate	C6H11NO4	+	162.0761	0.07	13.79	12.83	355023
18	Taurocholate	C26H45NO7S	-	514.28442	0.05	4.83	4.26	1596909
19	Phenylacetyl glycine	C10H11NO3	-	192.06676	0.73	5.94	5.73	4660581
20	Phenylpyruvate	C9H8O3	-	163.04025	1.14	5.72	5.57	1528
21	succinate semialdehyde	C4H6O3	-	101.0245	0.8	6.4	6.26	4794
22	3-(4-Hydroxyphenyl)pyruvate	C9H8O4	-	179.03506	0.46	5.79	6.69	53061
23	FMN	C17H21N4O9P	-	455.09833	2.17	9.52	10.34	107234
24	L-Gulono-1_4-lactone	C6H10O6	-	177.04059	0.72	9.35	8.4	1242
25	dIMP	C10H13N4O7P	-	331.04575	2.53	11.37	12.32	69755
26	sn-Glycerol 3-phosphate	C3H9O6P	-	171.00676	2.12	12.08	12.82	49242
27	sucrose	C12H22O11	-	341.1095	1.65	12.34	13.08	122554
28	Mesaconate	C5H6O4	-	129.01945	0.95	6.11	5.63	34952
29	2-Oxoglutarate	C5H6O5	-	145.0143	0.35	7.15	7.72	190231
30	(S)-Malate	C4H6O5	-	133.0143	0.38	14.43	13.81	308325
31	3-Phospho-D-glycerate	C3H7O7P	-	184.98576	0.55	14.68	14.09	11416
32	(R)-Lactate	C3H6O3	-	89.02455	1.51	9.28	9.61	45571

Apéndice A4.

Peak Num	Compound Name	Formula	Polarity	Detected m/z	Delta (ppm)	Expected RT	Actual RT	Adduct1 H+
1	Thiopurine S-methylether	C6H6N4S	+	167.03848	-0.66	6.39	5.94	3994723
2	5'-Methylthioadenosine	C11H15N5O3S	+	298.09631	-1.75	10.47	8.03	12521
3	Nicotinamide	C6H6N2O	+	123.05518	-0.86	9.4	6.57	10620987
4	Pyridoxal	C8H9NO3	+	168.0658	1.64	14.32	11.43	15081
5	6-Methylaminopurine	C6H7N5	+	150.07719	-1.52	13.14	10.29	20760
6	Deoxyadenosine	C10H13N5O3	+	252.10873	-1.51	11.77	9.25	63707
7	Pantothenate	C9H17NO5	+	220.11763	-1.45	7.02	8.54	4523750
8	Picolinic acid	C6H5NO2	+	124.03922	-0.72	8.03	8.63	552002
9	thymine	C5H6N2O2	+	127.05021	0.04	7.18	7.04	176831
10	Adenosine	C10H13N5O4	+	268.10327	-2.83	12.09	10.22	2647
11	Hypoxanthine	C5H4N4O	+	137.04572	-0.53	9.4	9.84	694656
12	5-Oxoproline	C5H7NO3	+	130.04977	-0.73	7.65	10.16	2759800
13	HEPES	C8H18N2O4S	+	239.10573	-1.15	7.19	10.07	4101776
14	L-Kynurenine	C10H12N2O3	+	209.09193	-0.64	11.96	10.13	760547
15	Betaine	C5H11NO2	+	118.08598	-2.3	13.39	10.45	17240884
16	cytosine	C4H5N3O	+	112.05032	-1.92	15.42	12.58	260327
17	FAD	C27H33N9O15P2	+	786.16211	-2.93	9.3	10.45	199426
18	L-isoleucine	C6H13NO2	+	132.10185	-0.4	12.58	10.86	2287879
19	Methylcysteine	C4H9NO2S	+	136.04243	-1.77	12.83	10.96	183055
20	Ala-Gly	C5H10N2O3	+	147.07634	-0.54	9.69	11.2	334526
21	Guanosine	C10H13N5O5	+	284.09821	-2.6	11.13	11.56	12617
22	dAMP	C10H14N5O6P	+	332.07498	-1.4	13.25	11.26	1143736

Peak Num	Compound Name	Formula	Polarity	Detected m/z	Delta (ppm)	Expected RT	Actual RT	Adduct1 H+
23	1-Aminocyclopropane-1-carboxylate	C4H7NO2	+	102.05479	-1.65	14.59	11.59	178416
24	L-Carnitine	C7H15NO3	+	162.11238	-0.55	15.25	13.1	3412
25	L-Tyrosine	C9H11NO3	+	182.08118	0.04	13.25	11.92	164446
26	4-Trimethylammoniobutanoate	C7H15NO2	+	146.11754	-0.12	14.94	13.1	30626
27	AMP	C10H14N5O7P	+	348.06958	-2.24	12.56	11.86	393271
28	NAD+	C21H27N7O14P2	+	664.11548	-1.38	11.41	11.92	46419
29	Glycylglycine	C4H8N2O3	+	133.06059	-1.32	9.91	12.4	56084
30	Phenol	C6H6O	+	95.04909	-0.57	5.71	3.89	8712
31	L-Alanine	C3H7NO2	+	90.05505	1.1	14.44	12.9	97998
32	Choline phosphate	C5H14NO4P	+	184.07329	-0.18	17	14.59	5710
33	dCMP	C9H14N3O7P	+	308.06366	-1.8	14.36	12.67	18392
34	L-2-Amino adipate	C6H11NO4	+	162.0761	0.07	13.79	12.83	355023
35	L-homoserine	C4H9NO3	+	120.06552	0.01	14.42	13.07	639567
36	N-Acetylornithine	C7H14N2O3	+	175.10757	-0.82	15.62	12.93	1600615
37	4-Aminopyruvate	C4H9NO2	+	104.07043	-1.71	15.25	13.2	736224
38	L-Cystathionine	C7H14N2O4S	+	223.07434	-1.63	16.7	14	18038
39	Choline	C5H13NO	+	104.10681	-1.72	15.44	12.49	67522
40	L-Ornithine	C5H12N2O2	+	133.09706	-0.7	20.2	18.27	51609
41	Taurocholate	C26H45NO7S	-	514.28442	0.05	4.83	4.26	1596909
42	Lipoate	C8H14O2S2	-	205.03647	1.09	5.55	4.36	382174
43	Phenylacetyl glycine	C10H11NO3	-	192.06676	0.73	5.94	5.73	4660581
44	Phenylpyruvate	C9H8O3	-	163.04021	0.86	5.72	4.57	179700
45	succinate semialdehyde	C4H6O3	-	101.02442	0.04	6.4	4.47	20632
46	N-Acetylglutamine	C7H12N2O4	-	187.07248	0.26	8.74	10.15	542738
47	3-(4-Hydroxyphenyl)pyruvate	C9H8O4	-	179.03506	0.46	5.79	6.69	53061
48	FMN	C17H21N4O9P	-	455.09833	2.17	9.52	10.34	107234
49	L-Gulono-1,4-lactone	C6H10O6	-	177.04068	1.24	9.35	12.14	87749
50	Orotidine	C10H12N2O8	-	287.05234	0.87	9.83	11.61	225929
51	N-Acetylneuraminic acid	C11H19NO9	-	308.09918	1.55	14.18	11.97	111201
52	dUMP	C9H13N2O8P	-	307.03415	1.54	10.63	12.04	126375
53	allantoin	C4H6N4O3	-	157.03676	0.29	11.57	13.12	10307
54	dIMP	C10H13N4O7P	-	331.04575	2.53	11.37	12.32	69755
55	sn-Glycerol 3-phosphate	C3H9O6P	-	171.00676	2.12	12.08	12.82	49242
56	sucrose	C12H22O11	-	341.1095	1.65	12.34	13.08	122554
57	Mesaconate	C5H6O4	-	129.01945	0.95	6.11	5.63	34952
58	2-Oxoglutarate	C5H6O5	-	145.0143	0.35	7.15	7.72	190231
59	GMP	C10H14N5O8P	-	362.05167	2.61	12.16	13.29	53358
60	(S)-Malate	C4H6O5	-	133.0143	0.38	14.43	13.81	308325
61	3-Phospho-D-glycerate	C3H7O7P	-	184.98576	0.55	14.68	14.09	11416
62	GDP	C10H15N5O11P2	-	442.01816	2.5	12.09	14.54	40456
63	CTP	C9H16N3O14P3	-	481.97809	1.77	11.84	14.64	20448
64	(R)-Lactate	C3H6O3	-	89.02455	1.51	9.28	9.61	45571

Apéndice A5.

Peak Num	Compound Name	Formula	Polarity	Detected m/z	Delta (ppm)	Expected RT	Actual RT	Adduct1 H+
1	lipoamide	C8H15NOS2	+	206.06648	-1.45	8.16	8.16	4380
2	Isonicotinic acid	C6H5NO2	+	124.0392	-0.85	9.04	9.76	58773

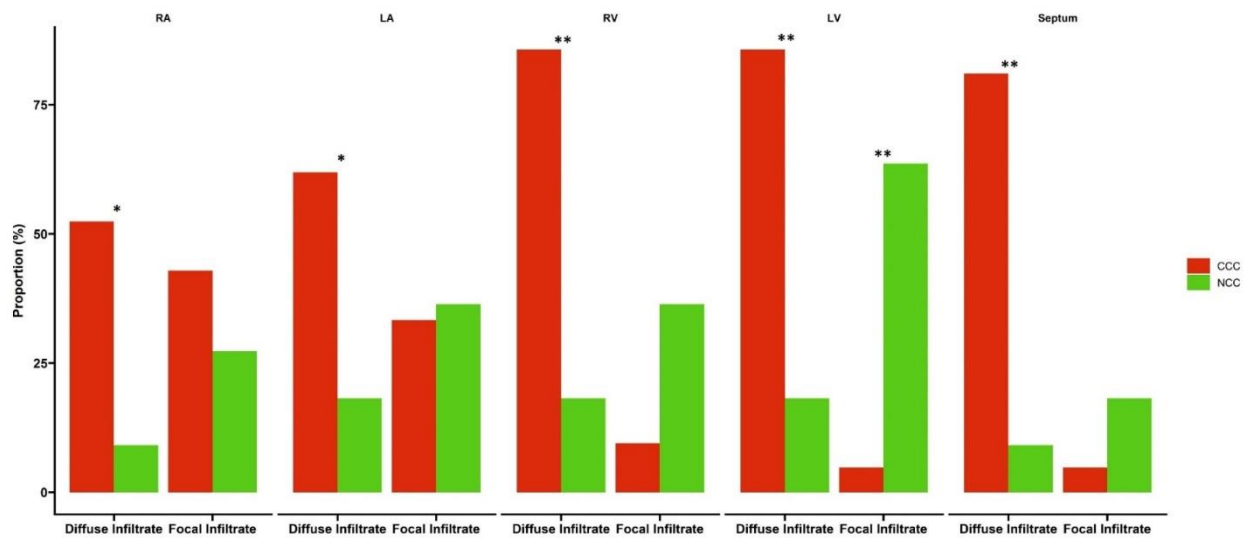
Peak Num	Compound Name	Formula	Polarity	Detected m/z	Delta (ppm)	Expected RT	Actual RT	Adduct1 H+
3	O-Acetylcarnitine	C9H17NO4	+	204.12283	-0.99	13.63	14.34	1461
4	L-Homocysteine	C4H9NO2S	+	136.04256	-0.87	12.68	13.54	46672
5	5-Aminolevulinate	C5H9NO3	+	132.06548	-0.33	15.85	14.9	3697
6	glutathione	C10H17N3O6S	+	308.09039	-2.24	12.51	13.37	44760
7	Acetylcholine	C7H15NO2	+	146.11729	-1.79	14.44	14.59	10252627
8	L-Cystine	C6H12N2O4S2	+	241.03072	-1.7	11.76	11.38	2345
9	Homocystine	C8H16N2O4S2	+	269.0618	-2.33	12.68	13.54	45671
10	Mercaptoethanol	C2H6OS	+	79.02124	0.36	8.45	8.73	324477
11	Benzoate	C7H6O2	-	121.02918	-2.65	5.7	6.1	1474828
12	D-Glucono-1_4-lactone	C6H10O6	-	177.0405	0.2	8.39	8.18	26674
13	Acetoacetate	C4H6O3	-	101.0244	-0.18	11.42	12.28	5213
14	D-Fructose	C6H12O6	-	179.05634	1.25	11.42	12.28	13927
15	Orthophosphate	H3O4P	-	96.96952	-1.01	13.67	13.46	432896
16	D-Fructose 6-phosphate	C6H13O9P	-	259.02237	-0.28	12.48	13.39	429049
17	pyrophosphate	H4O7P2	-	176.93585	-0.55	13.67	13.49	126201

Apéndice A6.

Peak Num	Compound Name	Formula	Polarity	Detected m/z	Delta (ppm)	Expected RT	Actual RT	Adduct1 H+
1	lipoamide	C8H15NOS2	+	206.06628	-2.42	8.16	6.24	28596
2	2-Aminobutan-4-olide	C4H7NO2	+	102.05485	-1.05	16.42	13.75	1936
3	Isonicotinic acid	C6H5NO2	+	124.03896	-2.82	9.04	7.6	13805807
4	O-Acetylcarnitine	C9H17NO4	+	204.12297	-0.31	13.63	11.21	1138460
5	L-Homocysteine	C4H9NO2S	+	136.04256	-0.87	12.68	13.54	46672
6	5-Aminolevulinate	C5H9NO3	+	132.0654	-0.91	15.85	13.34	10369
7	gamma-L-Glutamyl-L-cysteine	C8H14N2O5S	+	251.06923	-1.55	10.26	12.39	265422
8	glutathione	C10H17N3O6S	+	308.09039	-2.24	12.51	13.37	44760
9	Acetylcholine	C7H15NO2	+	146.11729	-1.79	14.44	14.59	10252627
10	L-Cystine	C6H12N2O4S2	+	241.03067	-1.89	11.76	13.58	48745
11	Homocystine	C8H16N2O4S2	+	269.0618	-2.33	12.68	13.54	45671
12	S-glutathionyl-L-cysteine	C13H22N4O8S2	+	427.09399	-2.78	11.56	13.75	6354
13	Mercaptoethanol	C2H6OS	+	79.02111	-1.29	8.45	6.45	60915253
14	Glutathione disulfide	C20H32N6O12S2	+	613.15784	-2.29	11.47	13.82	293345
15	Bis-gamma-glutamylcystine	C16H26N4O10S2	+	499.1156	-1.42	11.29	14.13	52539
16	Benzoate	C7H6O2	-	121.02918	-2.65	5.7	6.1	1474828
17	D-Glucono-1_4-lactone	C6H10O6	-	177.0405	0.2	8.39	8.18	26674
18	Acetoacetate	C4H6O3	-	101.02444	0.19	11.42	8.62	8007
19	D-Fructose	C6H12O6	-	179.05634	1.25	11.42	12.28	13927
20	Orthophosphate	H3O4P	-	96.96952	-1.01	13.67	13.46	432896
21	Itaconate	C5H6O4	-	129.01936	0.24	6.42	8.18	86410
22	D-Fructose 6-phosphate	C6H13O9P	-	259.02237	-0.28	12.48	13.39	429049
23	2-phospho-D-glycerate	C3H7O7P	-	184.98552	-0.77	12.39	13.91	427577
24	pyrophosphate	H4O7P2	-	176.93585	-0.55	13.67	13.49	126201

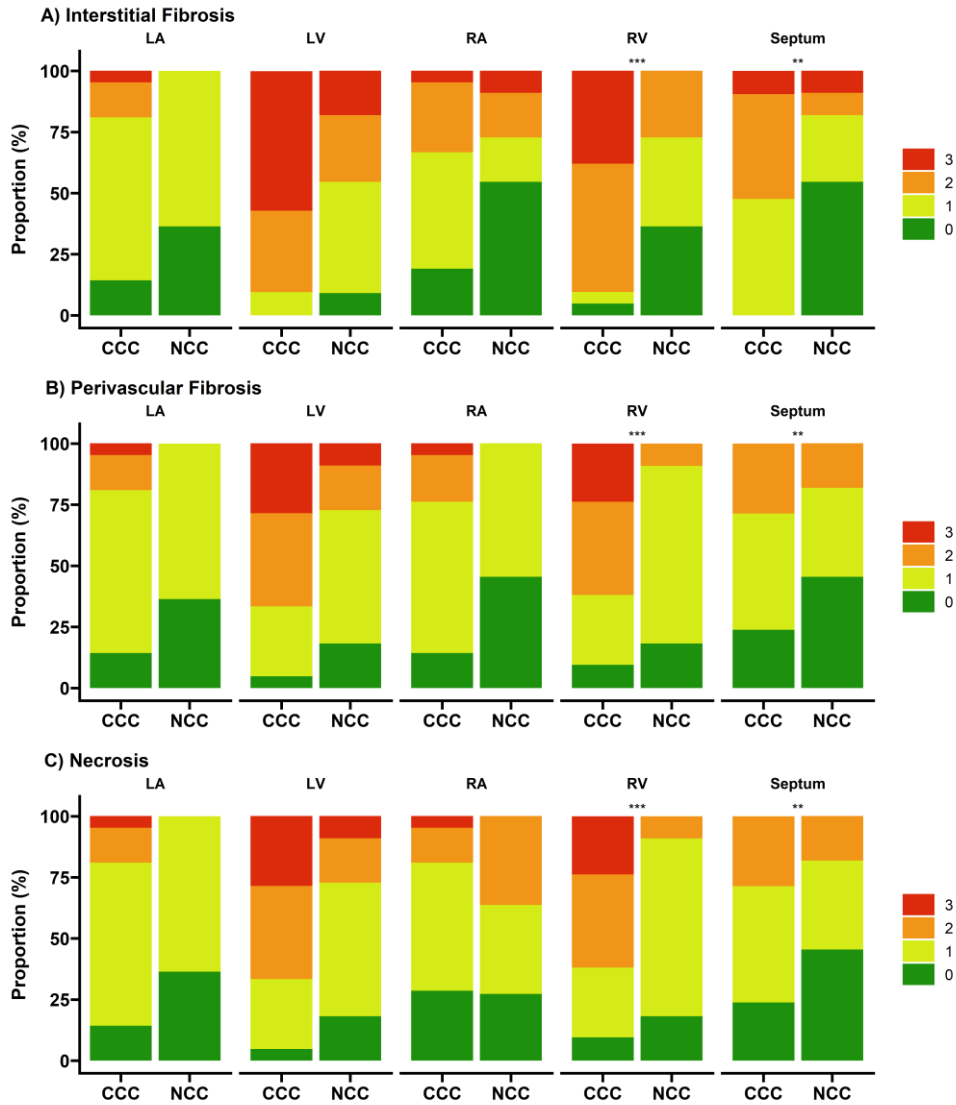
Apéndice B. Análisis histopatológico de los tejidos de miocardio

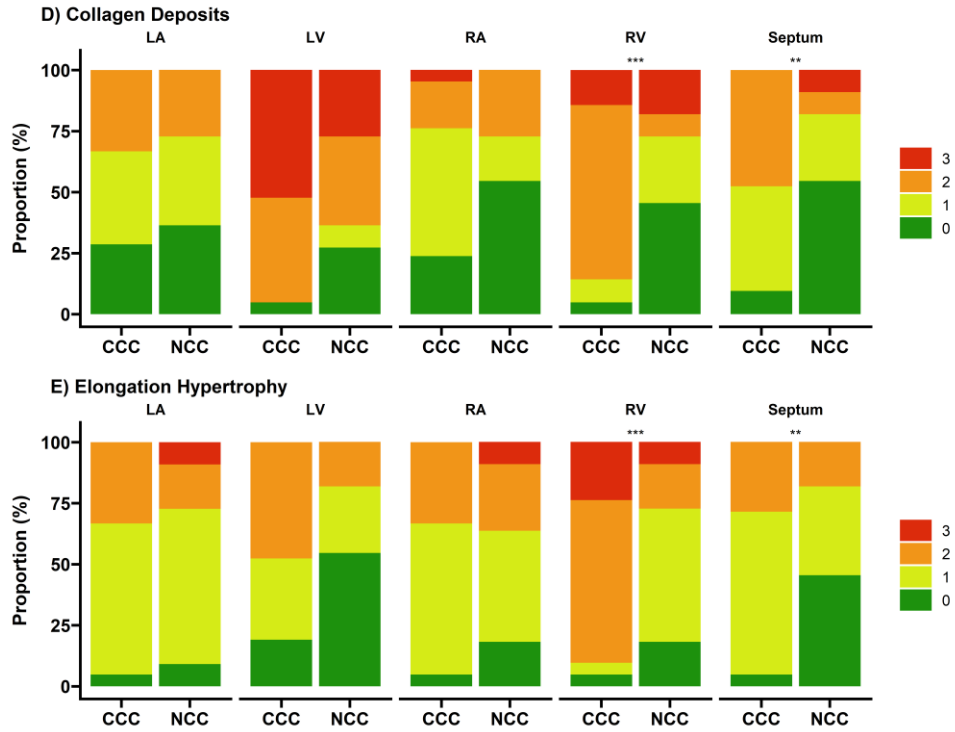
Apéndice B1. Distribución de la abundancia del infiltrado inflamatorio en tejido cardiaco de pacientes con CCC



Nota: Comparación del infiltrado inflamatorio (focal y difuso) en el tejido cardiaco de pacientes con CCC y CNC. Significancia estadística * $P < 0.05$; ** $p \leq 0.01$; *** $p \leq 0.001$. *Abreviaciones:* RA: aurícula derecha; LA: aurícula izquierda; RV: ventrículo derecho; LV: ventrículo izquierdo.

Apéndice B2. Distribución de fibrosis, hipertrofia y elongación entre los grupos CCC y CNC





Apéndice C. Tabla con el análisis Gene Ontology en la comparación CCC vs sano.

Proceso biológico (GO)			
Identificación de la vía (ID)	Descripción de la vía	Número de genes	Tasa de falso descubrimiento (FDR)
GO: 0018146	Proceso biosintético keratan sulfato	5	1.35e-07
GO:0030199	Organización colágeno fibrilar	3	0.00365
GO:0031581	Ensamble hemidesmosoma	2	0.0325
GO:0043436	Procesos metabólicos oxoácidos	6	0.0227
GO: 00031581	Proceso catabólico keratan sulfato	2	0.0325
Función molecular (GO)			
GO:0005198	Actividad de molécula estructural	8	5.74e-06
GO:0005201	Constituyente matriz estructural extracelular	4	0.000238
GO:0003945	Actividad N acetylglucosamina sintasa	2	0.00413
GO:0003831	Actividad β -N acetyl glucosamina glucopéptido	2	0.00515
Componente celular (GO)			
GO: 0044421	Parte de la región extracelular	13	1.13e-05
GO:0005576	Región extracelular	13	3.19e-05
GO:0031012	Matriz extracelular	6	3.196e-05
GO: 0070062	Exosoma extracelular	12	6.88e-07
GO:005796	Filamento queratina	4	0.000482
Vías KEGG			
00533	Biosíntesis glicosaminoglicanos	3	4.14e-05
00514	Biosíntesis de otros tipos de O-glicano	2	0.0221
00601	Biosíntesis de glicoesfingolípidos	2	0.0221
005110	Biosíntesis de N glicanos	2	0.0398

Apéndice D. Tabla con las vías canónicas obtenidas a partir del análisis integrado de las proteínas y metabolitos en la comparación CCC vs CNC

Ingenuity Canonical Pathways	-log(p-value)	Ratio	Molecules
Mechanisms of Viral Exit from Host Cells	4.14	0.0732	ACTB,ACTG1,LMNB1
RhoA Signaling	3.97	0.032	ACTB,ACTG1,ARPC3,PPP1R12B
Signaling by Rho Family GTPases	3.92	0.0203	ACTB,ACTG1,ARPC3,PPP1R12B,VIM
L-carnitine Biosynthesis	3.54	0.0154	L-carnitine,NAD
Remodeling of Epithelial Adherens Junctions	3.49	0.0441	ACTB,ACTG1,ARPC3
Caveolar-mediated Endocytosis Signaling	3.36	0.04	ACTB,ACTG1,COPE
RhoGDI Signaling	3.31	0.0215	ACTB,ACTG1,ARPC3,PPP1R12B
NRF2-mediated Oxidative Stress Response	3.29	0.0212	ACTB,ACTG1,PPIB,SOD1
Ketolysis	3.2	0.105	BDH2,NAD
Ketogenesis	3.15	0.1	BDH2,NAD
Crosstalk between Dendritic Cells and Natural Killer Cells	3.13	0.0333	ACTB,ACTG1,HLA-DRB1
Integrin Signaling	3.08	0.0187	ACTB,ACTG1,ARPC3,PPP1R12B
Regulation of Actin-based Motility by Rho	3.05	0.0312	ACTB,ARPC3,PPP1R12B
Actin Cytoskeleton Signaling	3.03	0.018	ACTB,ACTG1,ARPC3,PPP1R12B
Fcγ Receptor-mediated Phagocytosis in Macrophages and Monocytes	3	0.03	ACTB,ACTG1,ARPC3
Lysine Degradation V	2.96	0.08	glutaric acid,NAD
NAD biosynthesis II (from tryptophan)	2.74	0.0625	L-formylkynurenine,NAD
B Cell Development	2.64	0.0556	HLA-DRB1,IGHM
Cellular Effects of Sildenafil (Viagra)	2.54	0.0208	ACTB,ACTG1,PPP1R12B
Purine Nucleotides De Novo Biosynthesis II	2.53	0.0488	NAD ,PAICS
Epithelial Adherens Junction Signaling	2.46	0.0195	ACTB,ACTG1,ARPC3
Tryptophan Degradation III (Eukaryotic)	2.4	0.0417	L-formylkynurenine,NAD
Cdc42 Signaling	2.35	0.0178	ARPC3,HLA-DRB1,PPP1R12B
MSP-RON Signaling Pathway	2.22	0.0339	ACTB,ACTG1
ILK Signaling	2.2	0.0156	ACTB,ACTG1,VIM
Clathrin-mediated Endocytosis Signaling	2.17	0.0153	ACTB,ACTG1,ARPC3
Actin Nucleation by ARP-WASP Complex	2.05	0.0278	ARPC3,PPP1R12B
Sorbitol Degradation I	2.01	0.2	NAD
Agrin Interactions at Neuromuscular Junction	1.97	0.025	ACTB,ACTG1
Glycine Biosynthesis II	1.93	0.167	NAD
UDP-D-xylose and UDP-D-glucuronate Biosynthesis	1.86	0.143	NAD
Choline Degradation I	1.86	0.143	NAD
Glycerol-3-phosphate Shuttle	1.86	0.143	NAD
Death Receptor Signaling	1.86	0.022	ACTB,ACTG1

Ingenuity Canonical Pathways	$-\log(p\text{-value})$	Ratio	Molecules
Communication between Innate and Adaptive Immune Cells	1.81	0.0206	HLA-DRB1,IGHM
Retinoate Biosynthesis II	1.81	0.125	NAD
Proline Degradation	1.81	0.125	NAD
Taurine Biosynthesis	1.81	0.125	NAD
FAK Signaling	1.8	0.0204	ACTB,ACTG1
Branched-chain α -keto acid Dehydrogenase Complex	1.76	0.111	NAD
Threonine Degradation II	1.76	0.111	NAD
Methylglyoxal Degradation VI	1.76	0.111	NAD
VEGF Signaling	1.74	0.019	ACTB,ACTG1
Paxillin Signaling	1.72	0.0185	ACTB,ACTG1
β -alanine Degradation I	1.71	0.1	NAD
Pyruvate Fermentation to Lactate	1.71	0.1	NAD
2-ketoglutarate Dehydrogenase Complex	1.71	0.1	NAD
Superoxide Radicals Degradation	1.71	0.1	SOD1
2-amino-3-carboxymuconate Semialdehyde Degradation to Glutaryl-CoA	1.71	0.1	NAD
4-aminobutyrate Degradation I	1.71	0.1	NAD
Virus Entry via Endocytic Pathways	1.68	0.0177	ACTB,ACTG1
Phenylethylamine Degradation I	1.67	0.0909	NAD
D-glucuronate Degradation I	1.67	0.0909	NAD
4-hydroxyproline Degradation I	1.67	0.0909	NAD
Phenylalanine Degradation I (Aerobic)	1.67	0.0909	NAD
Acetyl-CoA Biosynthesis I (Pyruvate Dehydrogenase Complex)	1.63	0.0833	NAD
Ascorbate Recycling (Cytosolic)	1.63	0.0833	NAD
NAD Biosynthesis III	1.63	0.0833	NAD
Glutamate Degradation III (via 4-aminobutyrate)	1.63	0.0833	NAD
CD28 Signaling in T Helper Cells	1.6	0.016	ARPC3,HLA-DRB1
L-DOPA Degradation	1.6	0.0769	NAD
Pentose Phosphate Pathway (Non-oxidative Branch)	1.6	0.0769	TKT
NAD Salvage Pathway III	1.6	0.0769	NAD
Glycine Cleavage Complex	1.6	0.0769	NAD
Arginine Degradation I (Arginase Pathway)	1.6	0.0769	NAD
Serine Biosynthesis	1.57	0.0714	NAD
Aspartate Degradation II	1.57	0.0714	NAD
Granzyme B Signaling	1.51	0.0625	LMNB1
Inosine-5'-phosphate Biosynthesis II	1.51	0.0625	PAICS
Tryptophan Degradation to 2-amino-3-carboxymuconate Semialdehyde	1.51	0.0625	L-formylkynurenine
4-hydroxybenzoate Biosynthesis	1.51	0.0625	NAD

Ingenuity Canonical Pathways	$-\log(p\text{-value})$	Ratio	Molecules
NAD Biosynthesis from 2-amino-3-carboxymuconate Semialdehyde	1.48	0.0588	NAD
Serotonin and Melatonin Biosynthesis	1.48	0.0588	5-hydroxytryptophan
2-oxobutanoate Degradation I	1.48	0.0588	NAD
Superpathway of Serine and Glycine Biosynthesis I	1.44	0.0526	NAD
Lysine Degradation II	1.44	0.0526	NAD
Glucose and Glucose-1-phosphate Degradation	1.41	0.05	gluconolactone
NAD Phosphorylation and Dephosphorylation	1.41	0.05	NAD
Mitochondrial L-carnitine Shuttle Pathway	1.39	0.0476	L-carnitine
Urate Biosynthesis/Inosine 5'-phosphate Degradation	1.37	0.0455	NAD
Pentose Phosphate Pathway	1.37	0.0455	TKT
Guanosine Nucleotides Degradation III	1.37	0.0455	NAD
Glucocorticoid Biosynthesis	1.37	0.0455	NAD
Mineralocorticoid Biosynthesis	1.37	0.0455	NAD
Tec Kinase Signaling	1.37	0.012	ACTB,ACTG1
Tight Junction Signaling	1.37	0.0119	ACTB,ACTG1
Fatty Acid α -oxidation	1.35	0.0435	NAD
Germ Cell-Sertoli Cell Junction Signaling	1.34	0.0115	ACTB,ACTG1
Methylglyoxal Degradation III	1.32	0.04	NAD

Apéndice E. Lista de funciones biológicas generado por la integración de los datos proteómicos y metabólicos.

Category	p-value	Molecules
Cellular Movement	3.31E-07- 7.93E-03	5- hydroxytryptophan,ACTB,ACTG1,ANXA1,ARPC3,BST1,CD9,CORO1A,CRIP2,DCN,FBLN2,HUWE1,IGHM,LCP1,LMNB1,LUM,PPIB,S100A4,SERPINB1,SOD1,TAGLN2,TKT,VIM
Immune Cell Trafficking	3.31E-07- 7.83E-03	5- hydroxytryptophan,ACTB,ANXA1,BST1,CD9,CORO1A,DCN,IGHM,LCP1,LMNB1,LUM,PPIB,S100A4,SERPINB1,SOD1
Hematological System Development and Function	1.51E-06- 7.83E-03	5-hydroxytryptophan,ACTB,ANXA1,BST1,CD9,CORO1A,DCN,HLA-DRB1,IGHM,LCP1,LMNB1,LUM,MZB1,NAD,PPIB,S100A4,SERPINB1,SOD1,VIM
Connective Tissue Disorders	3.78E-06- 7.83E-03	ACTB,ACTG1,ANXA1,ASPN,DCN,LCP1,LUM,PPIB,S100A4,SOD1
Developmental Disorder	3.78E-06- 7.93E-03	ACTB,ACTG1,ANXA1,ASPN,DCN,HLA-DRB1,HUWE1,L-carnitine,LDB3,LUM,PPIB,SOD1,TKT,VIM
Hereditary Disorder	3.78E-06- 7.83E-03	ACTB,ACTG1,ASPN,CORO1A,DCN,HLA-DRB1,HUWE1,IBA57,IGHM,L-carnitine,LDB3,LMNB1,LUM,PPIB,SOD1,TKT,VIM
Ophthalmic Disease	3.78E-06- 6.02E-03	ACTB,ACTG1,ANXA1,DCN,LUM,SOD1,TKT,VIM
Organismal Injury and Abnormalities	3.78E-06- 8.61E-03	ACTB,ACTG1,ANXA1,ASPN,BST1,CD9,COPE,CORO1A,COTL1,CRIP2,DAP,DCN,FBLN2,H2AC1,H2AC7,H2BC14,HLA-DRB1,HUWE1,IBA57,IGHM,L-carnitine,LCP1,LDB3,LMNB1,LUM,MZB1,NAD,PDLIM5,PPIB,PPP1R12B,RPL3,S100A4,SERPINB1,SOD1,TKT,VIM
Skeletal and Muscular Disorders	3.78E-06- 7.83E-03	ACTB,ACTG1,ANXA1,ASPN,CD9,COPE,DCN,HLA-DRB1,IBA57,IGHM,L-carnitine,LCP1,LDB3,LMNB1,LUM,NAD,PDLIM5,PPIB,RPL3,SOD1,VIM
Neurological Disease	5.48E-06- 8.61E-03	ACTB,ACTG1,ANXA1,COPE,CORO1A,DCN,HLA-DRB1,HUWE1,IBA57,IGHM,L-carnitine,LMNB1,LUM,NAD,RPL3,S100A4,SOD1,VIM
Inflammatory Response	7.49E-06- 7.83E-03	ACTB,ANXA1,ASPN,BST1,CD9,CORO1A,COTL1,DCN,HLA-DRB1,HUWE1,IGHM,L-carnitine,LCP1,LMNB1,LUM,MZB1,NAD,PPIB,S100A4,SERPINB1,SOD1,TAGLN2,TKT,VIM
Hair and Skin Development and Function	1.07E-05- 6.37E-03	BST1,DCN,FBLN2,LMNB1,LUM,PPIB,VIM
Auditory Disease	1.13E-05- 7.83E-03	ACTB,ACTG1,ANXA1,SOD1
Dermatological Diseases and Conditions	1.13E-05- 6.84E-03	ANXA1,DCN,HLA-DRB1,IGHM,LUM,VIM
Cell Morphology	1.59E-05- 7.83E-03	ACTB,ANXA1,ARPC3,ASPN,BST1,CD9,CORO1A,DCN,glutaric acid,HUWE1,IGHM,L-carnitine,LCP1,LDB3,LMNB1,LUM,PDLIM5,PPIB,S100A4,SOD1,VIM

Category	p-value	Molecules
Cellular Assembly and Organization	1.59E-05- 7.83E-03	ACTB,ACTG1,ANXA1,ARPC3,BST1,CD9,CORO1A,DCN,IGHM,L-carnitine,LCP1,LDB3,LMNB1,LUM,PDLIM5,PPIB,S100A4,SOD1,VIM
Cellular Function and Maintenance	2.4E-05- 8.38E-03	ACTB,ACTG1,ANXA1,ARPC3,BDH2,BST1,CD9,CORO1A,DAP,DCN,IGHM,L-carnitine,LCP1,LDB3,LMNB1,LUM,NAD ,PPIB,S100A4,SERPINB1,SOD1,VIM
Cellular Compromise	3.35E-05- 7.83E-03	ACTB,ACTG1,ANXA1,BST1,CD9,CORO1A,COTL1,DCN,HLA-DRB1,HUWE1,LDB3,NAD ,S100A4,SERPINB1,SOD1,TAGLN2,VIM
Psychological Disorders	3.4E-05- 7.83E-03	ACTB,ANXA1,COPE,DCN,LMNB1,LUM,RPL3,S100A4,SOD1,VIM
Inflammatory Disease	5.64E-05- 7.83E-03	ACTB,ANXA1,ASPN,DCN,IGHM,L-carnitine,LCP1,S100A4,SERPINB1,SOD1,TKT
Renal and Urological Disease	5.64E-05- 7.83E-03	DCN,IGHM,L-carnitine
Tissue Morphology	6.63E-05- 7.83E-03	ANXA1,BST1,CD9,CORO1A,DCN,GMFB,HLA-DRB1,IGHM,L-carnitine,LCP1,LDB3,LMNB1,LUM,MZB1,NAD ,PDLIM5,S100A4,SERPINB1,SOD1,TKT,VIM
Cellular Development	7.48E-05- 7.83E-03	ACTB,ACTG1,ANXA1,BST1,CD9,CORO1A,COTL1,DCN,HLA-DRB1,HUWE1,IGHM,L-carnitine,LCP1,LDB3,LMNB1,LUM,MZB1,NAD ,S100A4,SOD1,VIM
Cellular Growth and Proliferation	7.48E-05- 7.83E-03	ACTB,ACTG1,ANXA1,BST1,CD9,CORO1A,COTL1,DCN,HLA-DRB1,HUWE1,IGHM,L-carnitine,LCP1,LDB3,LMNB1,LUM,MZB1,NAD ,S100A4,SOD1,VIM
Connective Tissue Development and Function	7.48E-05- 7.83E-03	ACTB,CD9,DCN,HUWE1,IGHM,L-carnitine,LMNB1,LUM,PPIB,S100A4,SOD1,VIM
Tissue Development	7.48E-05- 7.83E-03	ACTB,ACTG1,ANXA1,BST1,CD9,COTL1,DCN,HUWE1,IGHM,L-carnitine,LCP1,LDB3,LMNB1,LUM,MZB1,NAD ,PPIB,S100A4,SOD1,TKT,VIM
Lipid Metabolism	7.94E-05- 5.88E-03	ANXA1,CD9,COTL1,IGHM,L-carnitine,MZB1,SOD1,VIM
Small Molecule Biochemistry	7.94E-05- 8.38E-03	ANXA1,BDH2,CD9,COTL1,glutaric acid,GMFB,IGHM,L-carnitine,MZB1,NAD ,PPIB,SOD1,VIM
Skeletal and Muscular System Development and Function	1.05E-04- 5.88E-03	ACTG1,ANXA1,CD9,DCN,IGHM,L-carnitine,LDB3,LMNB1,LUM,NAD ,PDLIM5,PPIB,S100A4,SOD1,VIM
Cancer	1.12E-04- 7.83E-03	ACTB,ACTG1,ANXA1,ASPN,BST1,CORO1A,COTL1,CRIP2,DAP,DCN,FBLN2,H2AC1,H2AC7,H2BC14,HLA-DRB1,HUWE1,IGHM,LCP1,LDB3,LUM,PDLIM5,PPP1R12B,RPL3,S100A4,SOD1,VIM
Cell Death and Survival	1.68E-04- 7.83E-03	ACTB,ANXA1,CD9,CORO1A,DAP,DCN,glutaric acid,GMFB,HLA-DRB1,HUWE1,IGHM,L-carnitine,LCP1,LMNB1,LUM,MZB1,NAD ,PPIB,RPL3,S100A4,SERPINB1,SH3BGRL3,SOD1,TAGLN2,VIM
Embryonic Development	1.68E-04- 7.83E-03	ACTG1,ANXA1,ARPC3,ASPN,BST1,CD9,DCN,HUWE1,IGHM,LCP1,LDB3,LMNB1,LUM,MZB1,SOD1,TKT,VIM
Cell-To-Cell Signaling and Interaction	1.75E-04- 7.83E-03	ACTB,ANXA1,CD9,CORO1A,DCN,HLA-DRB1,IGHM,L-carnitine,LCP1,LUM,PDLIM5,PPIB,S100A4,SOD1,VIM

Category	p-value	Molecules
Immunological Disease	1.99E-04- 8.16E-03	ACTB,ACTG1,ANXA1,CORO1A,DAP,DCN,H2AC1,HLA-DRB1,HUWE1,IGHM,LCP1,LUM,MZB1,PDLIM5,PPP1R12B,S100A4,SOD1,TKT,VIM
Antimicrobial Response	2.05E-04- 2.05E-04	DCN,IGHM
Protein Synthesis	2.26E-04- 5.88E-03	ANXA1,ARPC3,BDH2,CORO1A,EIF4H,IGHM,L-carnitine,MRPS27,NAD,PIIB,RPL3,S100A4,SERPINB1,SOD1,VIM
Organ Morphology	2.91E-04- 7.83E-03	ANXA1,DCN,GMFB,HUWE1,IGHM,LDB3,LMNB1,LUM,PDLIM5,S100A4,SOD1,TKT,VIM
Lymphoid Tissue	3.95E-04- 7.83E-03	ANXA1,BST1,CD9,CORO1A,DCN,HLA-DRB1,IGHM,LCP1,LUM,MZB1,NAD,PIIB,S100A4,SOD1,VIM
Structure and Development	7.83E-03	
Organismal Survival	4.32E-04- 1.13E-03	ACTB,ACTG1,ANXA1,DCN,gluconolactone,HUWE1,IGHM,L-carnitine,LCP1,LDB3,LMNB1,LUM,PIIB,S100A4,SERPINB1,SOD1,TKT,VIM
Organismal Development	4.73E-04- 7.83E-03	5-hydroxytryptophan,ACTB,ACTG1,ANXA1,ASPN,BST1,CD9,DCN,GMFB,HUWE1,IGHM,L-carnitine,LCP1,LDB3,LMNB1,LUM,MZB1,NAD,PDLIM5,S100A4,SOD1,TKT,VIM
Nervous System	4.82E-04- 7.83E-03	ACTB,ACTG1,ANXA1,CD9,CORO1A,COTL1,glutaric acid,GMFB,HUWE1,L-carnitine,LMNB1,LUM,S100A4,SOD1,TKT,VIM
Development and Function	7.83E-03	
Protein Degradation	5.04E-04- 5.04E-04	L-carnitine,SOD1
Hematological Disease	5.45E-04- 7.93E-03	ACTB,ACTG1,ANXA1,CORO1A,DAP,DCN,H2AC1,HLA-DRB1,HUWE1,IGHM,L-carnitine,LCP1,LUM,PDLIM5,PPP1R12B,RPL3,S100A4,SOD1,TKT,VIM
Respiratory Disease	5.45E-04- 7.83E-03	ACTB,ANXA1,CD9,S100A4,SERPINB1,TKT
Post-Translational Modification	5.67E-04- 7.83E-03	ARPC3,CORO1A,L-carnitine,SOD1
Cell Cycle	7.02E-04- 7.83E-03	DCN,IGHM,LMNB1,S100A4,SOD1,VIM
Drug Metabolism	8.37E-04- 5.88E-03	ANXA1,GMFB,IGHM,L-carnitine,PIIB,SOD1,VIM
Tumor Morphology	1.01E-03- 7.83E-03	DCN,IGHM,VIM
Cardiovascular Disease	1.04E-03- 7.93E-03	ANXA1,HLA-DRB1,IGHM,L-carnitine,LCP1,LDB3,LUM,PDLIM5,SOD1,TKT,VIM
Cardiovascular System	7.83E-03	
Development and Function	1.19E-03- 7.83E-03	ACTG1,ANXA1,CD9,DCN,FBLN2,HUWE1,IGHM,L-carnitine,LDB3,LMNB1,LUM,NAD,PDLIM5,S100A4,SOD1,TKT,VIM
Organ Development	1.19E-03- 7.83E-03	ACTG1,ANXA1,ASPN,BST1,CD9,DCN,IGHM,LCP1,LDB3,LMNB1,LUM,MZB1,SOD1,TKT,VIM
Cell Signaling	1.29E-03- 5.88E-03	ANXA1,ARPC3,CORO1A,DCN,IGHM,NAD,PIIB,S100A4,SOD1
Hematopoiesis	1.62E-03- 7.83E-03	ANXA1,BST1,CD9,CORO1A,DCN,IGHM,LCP1,LUM,MZB1,SOD1
Free Radical Scavenging	1.92E-03- 5.88E-03	L-carnitine,SOD1

Category	p-value	Molecules
Molecular	1.92E-03-	ANXA1,BDH2,DCN,GMFB,IGHM,L-carnitine,NAD ,PPIB,S100A4,SOD1
Transport	8.38E-03	
Antigen	1.96E-03-	DCN,IGHM,LCP1
Presentation	5.88E-03	
Carbohydrate	1.96E-03-	glutaric acid,IGHM,NAD ,TKT
Metabolism	7.83E-03	
Cell-mediated	1.96E-03-	
Immune	1.96E-03	ANXA1
Response		
Cellular	1.96E-03-	
Response to	3.92E-03	ACTG1
Therapeutics		
DNA		
Replication,	1.96E-03-	glutaric acid,HUWE1,IGHM,NAD ,PPIB,S100A4,SOD1,VIM
Recombination,	6.21E-03	
and Repair		
Dental	1.96E-03-	
Disease	1.96E-03	DCN
Digestive		
System	1.96E-03-	ASPN,DCN,HUWE1,TKT,VIM
Development	6.02E-03	
and Function		
Endocrine		
System	1.96E-03-	
Development	1.96E-03	ANXA1
and Function		

Apéndice F. Tabla con los datos generales del análisis metabólico.

peak id	Mass	RT	1.mzXML	2.mzXML	3.mzXML	4.mzXML	5.mzXML	6.mzXML	7.mzXML	14.mzXML	15.mzXML	16.mzXML	18.mzXML	19.mzXML	20.mzXML	21.mzXML	polarity
1	162.11	706.22	2.8E+07	5E+07	3.9E+07	5E+07	3E+07	4.8E+07	5E+07	5.7E+07	7E+07	6.6E+07	5.9E+07	6E+07	6E+07	5.8E+07	positive
2	323.22	705.65	30047.5	745577	90207.9	3E+05	49158	548278	425286	1899844	3E+06	2691559	2064651	2E+06	3E+06	2247688	positive
3	165.12	706.65	12047.6	22863	16387.8	21557	15977	22070.7	21069	28944.8	31323	27879.1	28037.7	25047	24659	28574	positive
4	204.52	706.05	7549.03	14126	9458.35	11949	7658.7	11833.1	11697	15517.9	20598	16406	18810.9	15966	16912	16230.6	positive
5	312.47	705.81	5061.85	8045	5991.97	8514	4420.9	9418.01	9297.7	11055.7	11580	11942.1	10423.1	9371.7	10380	10823.6	positive
6	132.08	771.69	2.1E+07	4E+07	3.8E+07	4E+07	3E+07	3.7E+07	3E+07	5.1E+07	4E+07	4.6E+07	4.7E+07	4E+07	5E+07	4.5E+07	positive
7	263.15	771.39	134762	2E+06	1310283	2E+06	772878	1639618	797547	3608276	3E+06	3180627	3149908	3E+06	3E+06	2849421	positive
8	525.28	771.41	NA	422782	NA	2E+05	NA	158828	37655	158828	682176	734223	856158	604693	546690	596577	positive
9	394.21	771.15	NA	110931	NA	NA	NA	53794.3	NA	196052	156974	147306	169705	134228	121254	140252	positive
10	134.08	771.25	80155.6	149114	126426	1E+05	92757	128185	96776	184142	161641	149548	157658	162626	138718	145935	positive
11	285.13	771.7	NA	28049	16657.4	23992	12016	18329.5	10314	31891.2	27570	29809.9	33532.5	32215	28646	33042.6	positive
12	258.11	743.19	2.2E+07	4E+07	2.6E+07	3E+07	2E+07	2.1E+07	1E+07	3.9E+07	3E+07	5E+07	4.1E+07	4E+07	4E+07	3.7E+07	positive
13	516.22	742.78	18072.8	87698	48968.8	1E+05	17764	25231	9378.6	287414	217452	437499	395657	206579	338831	171514	positive
14	261.12	742.6	13233.7	36820	24526.1	31743	13541	17042.8	10565	29811.6	27788	40143.6	30885.7	31548	40575	28351.3	positive
15	229.15	561.34	715325	9E+06	4678698	5E+06	2E+06	9868646	9E+06	4.8E+07	4E+07	4.4E+07	4.3E+07	4E+07	5E+07	4.3E+07	positive
16	457.3	560.87	NA	45873	11268.2	12004	NA	37144.6	56598	1668489	2E+06	1343751	1094088	1E+06	2E+06	1233950	positive
17	241.15	555.81	44825.5	128452	75385.6	64337	44708	201718	130004	721298	745539	777338	559894	802944	775074	706090	positive
18	231.16	561.35	2478.27	30283	17069.9	14299	6922	37001.5	30114	169104	157975	135671	150036	145393	169216	146596	positive
19	231.16	561.51	2080.17	28114	16050.8	17321	7896.2	33717.8	31405	147849	150488	138843	136615	142378	138172	133123	positive
20	457.28	561.43	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	34415.6	30820	29957.7	22571.8	25507	39131	27946.7	positive
21	118.09	632.6	6416450	6E+06	3579078	5E+06	2E+06	1E+07	5E+06	1.3E+07	1E+07	9883952	1.9E+07	1E+07	1E+07	1.1E+07	positive
22	137.05	591.11	8279034	7E+06	6395232	1E+07	1E+07	1.5E+07	1E+07	1.8E+07	1E+07	1.7E+07	9742596	2E+07	1E+07	1.3E+07	positive
23	273.08	591.09	36256.4	39968	28908	86797	86202	200321	117384	255886	184844	353047	108300	256621	130685	170970	positive
24	295.07	591.47	80612	79292	67930.3	2E+05	129314	148642	135610	177282	123428	122430	124572	187894	100763	124892	positive
25	130.05	785.71	4149670	1E+07	7718271	1E+07	6E+06	9195367	9E+06	1.2E+07	1E+07	1.2E+07	1.2E+07	1E+07	9E+06	9363555	positive
26	229.15	692.07	187371	4E+06	1896368	2E+06	650918	3427694	3E+06	NA	1E+07	1.4E+07	1.1E+07	1E+07	NA	NA	positive
27	202.18	464.13	7202599	6E+06	4364816	3E+06	3E+06	4172110	3E+06	1449153	2E+06	1072515	1437898	1E+06	1E+06	1776214	positive
28	166.09	581	823939	1E+06	1279477	3E+06	2E+06	2612037	3E+06	4187140	3E+06	5129098	2647055	3E+06	7E+06	5611302	positive
29	190.09	580.49	4338.56	NA	7249.99	14073	8867.2	10984.3	13247	21603.3	14259	23632.7	13142.6	12884	30719	23590	positive
30	496.34	251.32	676333	1E+06	1332693	2E+06	5E+06	3167920	2E+06	7998852	8E+06	4869800	5914067	9E+06	1E+07	7137887	positive
31	975.68	248.32	NA	NA	NA	NA	70283	22074.3	6993.6	319636	308569	112894	90334.9	344753	455608	327907	positive
32	525.37	243	75193.5	62579	72534.2	68839	203677	210179	97437	290838	320680	176224	200809	327416	344244	280925	positive
33	509.38	240.47	1980.65	10327	16523.5	9393	72010	51316.3	28717	138231	117343	85261.3	38885.4	178084	100349	102800	positive
34	933.63	249.92	NA	NA	NA	NA	22531	NA	NA	86439.6	90247	23921.7	36306.1	90723	142629	93908	positive
35	499.35	252.22	2927.94	5319.2	6338.64	6702	20744	17289.9	10327	44650	42358	24438.1	30009.6	42328	49950	34940.7	positive
36	511.36	247.38	2493.64	5876.4	7927.57	4247	23659	14738	9661	28227.8	26479	14163.6	16475.3	26611	29338	21645.7	positive
37	505.35	246.54	NA	1212.5	NA	1725	7937.3	3498.29	NA	12873.7	9335.8	9291.68	7592.89	10008	12550	10123.6	positive
38	504.31	244.77	965.28	NA	NA	1363	NA	2405.16	NA	8420.28	4637.6	6347.53	8054.29	7804.4	8549.2	6932.93	positive
39	158.12	804.32	1004675	1E+06	1043372	1E+06	9E+06	7501687	5E+06	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	positive
40	114.07	564.88	4174470	8E+06	4163020	8E+06	4E+06	7285654	5E+06	7921908	7E+06	8023256	6067653	8E+06	6E+06	8643372	positive
41	132.1	607.98	1018931	2E+06	1374025	4E+06	2E+06	1737055	3E+06	4706608	4E+06	5678767	2631838	3E+06	7E+06	5889972	positive
42	184.07	754	4100859	4E+06	3010880	4E+06	3E+06	6006678	5E+06	6845740	4E+06	4614121	7541056	6E+06	7E+06	4854182	positive
43	116.07	695.61	6556867	5E+06	3462628	5E+06	5E+06	4832044	4E+06	1004351	5E+06	6829488	4186283	4E+06	4E+06	4580487	positive
44	123.06	375.01	3969406	6E+06	3794730	6E+06	2E+06	6667421	4E+06	4405410	3E+06	3027111	2901148	3E+06	2E+06	2099209	positive
45	357.25	1008.5	63353	3E+06	1318765	3E+06	432939	2409164	3E+06	6353357	6E+06	4380289	4076833	3E+06	3E+06	3690086	positive
46	369.25	1007.3	NA	27485	10587.8	25910	4157.4	27968	14324	45736.7	35414	28820.9	28059.8	22962	28435	25634.9	positive
47	308.09	748.49	1056851	6E+06	2251437	4E+06	833006	3358576	4E+06	4446554	5E+06	1378035	3907124	3E+06	3E+06	3951508	positive
48	126.02	808.71	3507378	6E+06	4134187	6E+06	2E+06	4841258	4E+06	4002512	4E+06	3889484	2771519	3E+06	3E+06	3348410	positive
49	251.04	808.47	609515	1E+06	759002	1E+06	222707	1017173	672406	658234	750126	666785	367955	499686	419558	500883	positive
50	127.02	808.49	21399.8	40477	28553	39432	13105	31671.5	24161	23765.7	28285	27055.7	17527.2	18851	20071	21657.3	positive
51	175.12	1249.4	327808	986352	478433	1E+06	721510	823368	926681	1618923	2E+06	1597781	1398874	1E+06	3E+06	2133156	positive
52	349.23	1249.7	660.46	7994	2293.29	7804	4195.7	6287.62	6476.9	13411.8	14028	14910.4	12028.7	9276.3	28272	17514	positive
53	386.21	1249.3	7812.8	16173	10622.7	19078	17053	18527.1	18249	19530.5	18640	21446.9	18873.6	17951	23607	23195.6	positive
54	219.08	1249.8	568.56	4782.6	1674.81	4626	2418.7	3486.48	4238.5	7271.37	9053.9	9191.68	6786.99	6071.2	12350	9335.66	positive
55	348.07	715.66	901558	5E+06	965391	6E+05	9448.3	981097	594592	812872	793299	276246	2463988	2E+06	4E+06	597273	positive
56	136.06	545.38	145387	406670	881179	2E+06	88338	3670902	2E+06	5101890	4E+06	1490097	4833140	5E+06	4E+06	3943406	positive
57	148.06	767.63	2093404	2E+06	1821437	2E+06	834829	2585608	4E+06	2857009	1E+06	3328570	1639456	2E+06	3E+06	2475163	positive
58	269.09	621.83	1251646	3E+06	1726477	4E+06	1E+06	3073041	3E+06	2998298	3E+06	1503134	2388474	3E+06	3E+06	2794320	positive
59	537.17	622.66	346764	2E+06	771750	3E+06	257019	2168089	2E+06	2380438	3E+06	634901	2092679	2E+06	2E+06	2205776	positive
60	544.34	242.16	107276	106036	107705	2E+05	178234	270676	219064	376464	468650	325093	237963	271957	583500	793153	positive
61	182.08	715.56	245990	465860	567776	1E+06	722462	1218988	1E+06	1180199	1E+06	3353418	863125	1E+06	2E+06	1673253	positive
62	160.13	700.87	669465	1E+06	834989	6E+05	337700	1201432	976433	3498360	2E+06	1053942	1939045	1E+06	2E+06	1311309	positive
63	415.21	225.24	636558	574512	1116154	1E+06	1E+06	413993	1E+06	331227	976771	1101950	1270113	1E+06	2E+06	1899885	positive
64	220.12	517.23	520908	1E+06	332244	4E+05	304964	1277709	38076								

peak id	Mass	RT	1.mzXML	2.mzXML	3.mzXML	4.mzXML	5.mzXML	6.mzXML	7.mzXML	14.mzXML	15.mzXML	16.mzXML	18.mzXML	19.mzXML	20.mzXML	21.mzXML	polarity
66	302.2	283.34	957220	2E+06	407137	5E+05	393478	1170466	754331	165649	374275	276446	269525	190741	303595	470029	positive
67	229.15	661.66	17613.9	759819	289515	3E+05	79846	579081	687870	2543492	3E+06	3071838	2971257	2E+06	2E+06	2233112	positive
68	146.12	703.22	1282791	2E+06	1843437	1E+06	652254	1709869	2E+06	2291472	2E+06	2418487	2614367	2E+06	3E+06	2198460	positive
69	150.06	644.9	313918	347920	459734	1E+06	587397	726163	646570	1598864	1E+06	2287353	1066464	1E+06	2E+06	1917730	positive
70	151.06	644.71	1803.96	1876	2434.31	6428	3201.4	3744.97	4061.5	10328.4	7763.3	14623.6	5147.83	6443.8	13476	12789.9	positive
71	130.05	600.57	124783	NA	214625	5E+05	214789	324285	390097	748772	999837	2642346	NA	1E+06	709590	860139	positive
72	758.57	214.91	394973	61326	1267343	4E+05	2E+06	358228	1E+06	713536	1E+06	1761649	1837431	2E+06	2E+06	1085556	positive
73	784.58	211.99	59618.7	5825.2	212857	39618	392976	51705	341373	68089.7	221685	276730	252643	231890	200959	99246.3	positive
74	770.6	210.87	4580.95	2397.3	113722	11060	123382	12531.3	134597	27310.4	89420	81716.4	64408.6	102880	60416	37970.4	positive
75	785.65	222.53	4153.78	1713.8	18508.6	6914	33267	8505.7	12398	12589.5	15883	19784.8	10728.7	23911	22815	19523.9	positive
76	85.028	607.05	440925	416616	263038	1E+05	287657	874411	191903	434087	362667	447879	839871	494452	177616	255323	positive
77	205.12	607.24	15992.4	17869	11999.2	5721	11670	31482.4	9120.3	21228	16602	24075.3	33642.8	20850	9815.2	11738.1	positive
78	230.16	691.87	17351.2	460277	225901	2E+05	72842	416680	390565	2024543	2E+06	1749932	2315633	2E+06	1E+06	1616150	positive
79	248.11	695.61	6202.06	45629	42407.9	26630	18299	40925.4	24980	184862	161423	170718	325232	271963	178573	252363	positive
80	231.16	691.39	NA	13275	6344.63	5334	NA	13412.9	10792	55130	44427	44307.7	21903.3	43456	39254	41094.4	positive
81	72.081	684.99	364370	933528	494676	1E+06	567027	742091	790607	1359663	1E+06	1980283	NA	1E+06	2E+06	1633160	positive
82	104.07	796.97	1091904	2E+06	1174570	1E+06	889845	897381	1E+06	466214	1E+06	427350	475773	551777	606543	632432	positive
83	262.16	586.68	241863	NA	274802	5E+05	171739	883072	708131	943367	2E+06	1764597	1897395	2E+06	1E+06	1083900	positive
84	328.22	591.36	NA	3174.2	947.67	4273	NA	2162.5	3645.5	8776.04	11027	10795	9776.73	7090.8	4627.6	7018.78	positive
85	249.15	619.49	146165	214308	193760	1E+05	299578	146381	305182	379781	302478	82401	442350	260169	223973	636629	positive
86	276.18	515.2	88979.4	681654	374550	6E+05	408240	470235	698513	760517	1E+06	204769	1146938	545631	770434	1338427	positive
87	122.08	829.1	791491	1E+06	1748869	45823	1E+06	1259860	50611	1366959	1E+06	1612196	1523536	185158	123386	150820	positive
88	276.18	561.01	106200	322842	387190	4E+05	424666	398937	441272	304489	777815	152701	448091	807800	419475	1205424	positive
89	156.08	787.15	1745523	77357	381378	1E+06	69254	84975.3	75598	170713	177641	375661	166721	154197	180052	138601	positive
90	176.1	809.71	154647	302420	136939	2E+05	349072	181182	387423	NA	313092	608719	659221	552444	958479	1702459	positive
91	522.35	245.67	119750	221123	236669	4E+05	757803	563747	603466	1544035	1E+06	1174000	812614	1E+06	1E+06	1070323	positive
92	147.11	1159.4	30313.6	338635	149239	3E+05	135023	278429	247074	600703	740417	1100080	539737	358960	778925	662582	positive
93	223.02	1157.6	1040.38	6207.4	2845.13	6739	3508.5	6498.19	5415.7	9813.24	12493	15231.4	6828.27	5929.4	20319	15022.4	positive
94	207.05	1160.1	412.74	3861.6	1625.96	2966	1426.9	2639.84	2666.7	6448.95	7666.8	8419.02	5421.12	4387.6	8157.5	5893.54	positive
95	203.14	676.55	83262.7	767242	337085	3E+05	71433	880311	699532	650786	487047	777494	335143	288699	480220	475625	positive
96	761.59	213.14	163158	24005	1022085	2E+05	1E+06	341845	1E+06	197954	598219	446587	573462	616985	395251	324200	positive
97	780.59	209.9	NA	2061.3	206150	7984	99959	18750.3	125247	8475.67	41224	18971.1	32325.7	27285	29418	29612.9	positive
98	813.68	221.32	28794.8	5026.8	120248	25859	163455	69824.6	111481	43186.1	52085	51919.6	37404.6	93901	62890	69753	positive
99	809.59	211.25	13491.6	928.06	90529	8941	104956	15945.7	127435	9463.63	60080	41492.5	55531.5	45260	40210	26531.1	positive
100	764.56	211.78	NA	889.09	41278.7	7299	84000	10509.1	120180	5120.43	25620	14049.5	28347.3	16920	28658	22907.5	positive
101	780.55	212.33	5924.49	NA	39276.1	6592	66773	10909.8	85782	5374.48	20082	15124.6	19452.6	16292	18916	11326.8	positive
102	774.6	212.16	5006.39	907.66	60845.7	5486	44543	9925.74	58807	4767.88	18968	9964.36	13333.3	14108	9636.2	7929.92	positive
103	280.09	739.08	695746	613134	644124	8E+05	668257	389823	412582	739861	846588	466178	1365845	514797	1E+06	1260116	positive
104	703.57	228.09	580830	177747	882495	5E+05	979456	1354304	663013	904858	550585	480567	258813	870767	763620	857519	positive
105	130.09	678.69	24566.3	128273	57082.6	1E+05	40137	244098	44463	NA	124152	152977	1210186	103939	62552	76690.9	positive
106	203.15	1054.8	74069.8	483555	307932	4E+05	132774	671174	466426	575277	446578	1136423	346308	300191	482049	392123	positive
107	106.05	818.68	117196	299598	288864	4E+05	225110	351632	329613	NA	663161	1014522	372258	420507	667719	331751	positive
108	219.1	594.99	106588	617894	384033	6E+05	364491	568761	505683	821293	1E+06	741125	863947	1E+06	604064	612868	positive
109	120.07	763.52	151577	220904	207474	2E+05	242560	252351	314531	326049	607686	945291	380697	478163	622754	545382	positive
110	133.06	797.56	70281.2	153752	147743	2E+05	139568	254247	154971	346969	301978	942459	200848	288132	481917	323358	positive
111	205.15	960.01	72887.3	492155	191147	5E+05	67338	324866	303376	538403	503175	887651	500639	452517	412865	310247	positive
112	216.06	794.75	103744	276493	187916	3E+05	90496	129085	110877	881401	592334	862883	857959	683132	857943	509292	positive
113	203.18	461.2	876583	NA	479528	4E+05	398353	507131	317865	170766	231612	128025	162282	154928	148749	214853	positive
114	203.05	873.92	670715	557586	728478	5E+05	721306	601412	539994	446579	508863	863762	409800	730398	453897	572032	positive
115	165.08	754.39	133975	477184	180963	76109	787244	788458	577795	49667.3	98271	6424.15	98456.5	11812	102356	137402	positive
116	307.08	835.46	164218	541215	292950	9E+05	81742	332201	311502	585597	684723	154847	589393	515403	402578	442516	positive
117	613.16	834.91	53477.2	171678	85540.6	3E+05	25491	185359	146153	173272	255640	65924.8	121111	183355	87390	87215.7	positive
118	246.21	426.31	540319	682711	332328	4E+05	210643	341234	198083	145166	158603	110916	150026	145449	147727	203469	positive
119	153.07	434.52	65651.6	398958	114509	2E+05	63678	434513	325817	240722	160846	154671	80228.7	45680	65998	71952.6	positive
120	176.88	1116.3	440166	451212	310466	5E+05	437202	758652	430591	519892	612559	63318.6	249365	576227	434669	600121	positive
121	178.87	1116.7	94472.1	98179	68000.2	99850	94570	166260	96106	116277	131334	13359	49732.1	124900	93246	127487	positive
122	232.84	1115.7	81886.4	83384	53547	86767	78065	132809	78246	95793.1	95248	6054.65	30095.7	89408	73964	99398.8	positive
123	316.78	1110.7	39314	39554	24876.5	28600	36223	39149.9	32211	39452.3	41245	NA	9046.78	34413	31461	38092.4	positive
124	370.75	1111.3	40052.1	33807	19495.7	20438	31405	39768.8	28474	32808.2	36890	NA	5421.86	28685	26463	29397.6	positive
125	414.74	1109.7	25748.9	22069	12810.3	15061	20823	34333.4	17736	23546	25094	NA	3917.2	19698	15763	19654.8	positive
126	276.83	1111	22626	21173	13464.7	15728	20139	28851.3	16415	21810.3	22192	NA	6670.5	21077	15171	18447.7	positive
127	298.81	1112	13769.8	15538	12310.5	14943	14527	22220.4	14269	15530.2	19257	6271.73	11791.8	19792	12052	15334.5	positive
128	376.79	1110.4	18822.1	15258	9939.21	12738	14481	20869.8	12674	16636.4	17294	NA	3940.91	15509	11576		

peak id	Mass	RT	1.mzXML	2.mzXML	3.mzXML	4.mzXML	5.mzXML	6.mzXML	7.mzXML	14.mzXML	15.mzXML	16.mzXML	18.mzXML	19.mzXML	20.mzXML	21.mzXML	polarity
137	318.78	1113	4986.78	4226.2	2705.87	3406	4155.5	6323.7	3843.1	4365.97	4651.4	NA	1099.24	4438.3	3796.4	5070.04	positive
138	132.08	862.59	6526.04	504016	166483	89696	21141	76444.7	84701	748160	154729	681141	316110	141479	317459	144720	positive
139	128.95	987.27	242692	356666	304564	2E+05	421860	420048	314711	408062	459870	406330	353558	442704	411552	433080	positive
140	168.95	987.47	110451	156108	139579	1E+05	192676	202647	144190	192766	217571	188670	165423	209537	197993	198134	positive
141	234.92	984.72	97687.8	149992	124401	79655	191699	186915	135375	188210	201978	171723	153843	197900	174536	186149	positive
142	274.91	983.83	61867.9	98495	68867.8	45278	128038	120686	87067	125480	129108	109631	98418	134566	111659	114239	positive
143	340.88	983.44	34674.6	56712	35868.6	21450	79034	74262.7	52031	73528.5	80080	63883.1	55869.6	81926	70120	71810.9	positive
144	380.87	983.93	13828.1	23404	13580.6	8111	39389	34632.5	21930	33753.7	35033	26816.2	23165.3	40404	30029	32848	positive
145	318.9	982.45	18181.9	27561	20437.4	12296	37832	38538.3	25961	35111.5	38474	29623.9	33439	41252	35688	34166.4	positive
146	446.85	982.94	10345.3	17918	9566.77	6272	31064	26456.2	15966	27213.4	25515	18669.3	17724	29856	21970	25374.6	positive
147	424.86	983.92	7004.3	9783.4	6326.26	4214	18201	16412.2	10475	15049.9	14464	12055.8	12268.2	19966	13327	15080.6	positive
148	208.94	983.15	8710.78	12527	9389.24	5920	16936	17017.7	12398	16163	18153	14772.7	13688.9	18512	15582	15950.2	positive
149	296.92	982.94	7784.85	9675.1	7675.61	5664	15297	14995.2	9583.5	14224.2	13345	11606.7	14449.8	16641	13054	13580.4	positive
150	552.81	983.83	5084.75	7667.7	3961.05	2590	12758	10127.2	6481.6	9124.48	9663.2	7721	7314.24	11994	8789.2	9896.24	positive
151	486.84	982.85	4405.64	6723.2	3755.2	2472	12013	9550.21	6419.1	10197.3	9684.4	7528.54	7208.27	11278	9197.1	10074.2	positive
152	530.83	983.95	2941.22	4275.1	2708.14	1855	8153.2	6051.82	4448.4	6100.98	6045.6	5041.95	5233.64	7302.7	5205.2	6555.93	positive
153	314.9	983.23	3124.3	5036.6	3365.92	2035	7849.3	7195.58	4700.6	6732.36	6992.5	5827.24	5013.1	7636.9	6217.3	7199.89	positive
154	508.85	982.75	2719.31	3798.5	2160.26	1537	6301.8	5590.09	3973.8	4706.08	4105.9	4086.31	4697.77	7370.7	4361.1	4930.26	positive
155	636.79	982.78	2026.32	2750.6	1601.95	1107	5008.9	4108.91	2693.1	3790.44	4309.2	3132.21	3161.61	5253.3	3140.9	4474.95	positive
156	486.86	981.95	2328.96	2922.4	2176.73	1483	5145	4822.51	3146.5	4446.13	4039.3	3758	4222.03	5738.2	4279.1	4215.56	positive
157	592.83	983.54	1835.33	2764.1	1738.39	1137	4833.3	4026.69	2940.7	3648.82	3456.4	3168.87	2929.88	5091.1	3164.1	3837.84	positive
158	570.85	982.75	1918.54	2853	1622.72	1165	4580	3774.88	2748.4	3529.18	3463.6	2759.18	3321.61	4754.8	3483.5	4034.07	positive
159	698.79	983.03	1214.96	2151	1088.04	880.8	3614.6	2714.88	1692.3	2741.63	2359.1	1773.36	2418.66	3442	2456.4	2846.89	positive
160	583.32	223.34	22896.6	177312	23694.3	92868	35746	158239	25393	704662	512497	603084	252269	554888	611894	515812	positive
161	621.3	222.3	2273.55	11246	3907.78	14212	5716.9	16007.6	10260	38149.8	33411	55108.3	15835.7	36484	42216	34057.9	positive
162	76.076	612.15	90201.3	124496	16852.7	1E+05	55773	126744	78315	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	positive
163	508.38	240.44	8389.67	39554	53930.7	32578	280797	188233	106173	524865	433580	349717	155603	659211	393119	406319	positive
164	98.984	804.26	12637.9	35946	17980.3	29730	13985	10306.7	25296	NA	37322	15913.9	94042.6	22981	13831	15741.4	positive
165	124.09	670.96	48505.8	375226	253704	2E+05	9945	196074	309523	NA	204247	542100	NA	173390	NA	34392.5	positive
166	192.07	423.43	4945.7	2644	7984.87	9044	44512	449948	8804.5	262223	550307	314698	411165	590402	412208	374572	positive
167	156.08	872.06	123513	51612	204414	6E+05	30074	74907.2	48607	96033.3	89147	208702	82044.9	90841	118599	85346.6	positive
168	230.16	591.09	2910.24	96711	38082.9	46840	17718	102630	101780	555776	358581	366450	375475	467849	350533	367846	positive
169	316.21	238.36	286128	297937	237809	5E+05	446378	262811	447257	169405	212616	219896	441622	228607	447279	536997	positive
170	360.24	245.33	12808	12518	9364.59	12535	15979	9231.55	15489	5876.48	7436	8673.54	15351.6	7715.5	16241	20934.9	positive
171	124.06	423.79	83242.6	157288	330303	5E+05	190052	404906	384406	339168	234946	358914	291942	257726	203991	199459	positive
172	142.03	796.54	259485	281415	214669	3E+05	121623	509780	322785	262903	194194	219140	119836	185775	215686	161276	positive
173	247.09	599.76	29878.3	193152	74305.3	3E+05	19602	59908.9	75244	33496.7	81830	99712.3	29662.5	61305	50073	60261.8	positive
174	284.1	700.46	129109	194551	121148	5E+05	74071	500478	344583	224466	177837	50650.1	196916	217383	227914	128589	positive
175	227.11	795.26	231017	434553	318823	5E+05	232744	338465	418992	NA	234441	450399	301612	174222	230520	289278	positive
176	302.12	586.44	11492.5	97407	49797.2	2E+05	74323	149044	111569	333643	232081	314822	140037	191747	336887	255754	positive
177	134.03	508.48	353749	93362	159554	2E+05	175393	461076	367246	392233	399575	462399	190230	422550	403516	377181	positive
178	86.096	697.92	51749.4	363935	461156	87296	160287	319791	66328	106879	64183	64636.6	383472	192935	171707	200329	positive
179	627.53	197.89	206879	256800	399418	2E+05	197557	443469	320353	395966	376130	192211	218393	375658	387881	373449	positive
180	904.59	197.64	160598	197682	309136	1E+05	118254	350835	216248	308346	295052	137817	158324	289206	295093	267680	positive
181	887.56	197.29	76527.8	180873	159323	66277	55876	182052	132507	168741	157526	66047.9	74201.8	149294	141115	142637	positive
182	837.55	196.9	26981.9	38410	75851.5	16259	39964	52940.5	54663	42750.7	55208	33334.4	28097.2	66725	41423	50029.4	positive
183	812.54	196.7	24750.4	15668	37834.1	11752	20770	32987.6	34779	28427.6	26888	16096.2	18385.6	41216	42008	33713.3	positive
184	863.56	198.34	10397.6	27265	22077.4	11581	6529.1	21993.2	15925	25178.9	31718	27996.2	12694.8	28956	27197	28282.7	positive
185	651.53	196.53	2187.57	3864.8	8160.47	1518	3712.6	7557.21	9774.1	3846.74	6082.3	3138.16	2026.65	6731.2	4136.6	6438.87	positive
186	333.57	674.68	NA	13734	3827.81	14213	2732.4	16166.9	13786	330162	301245	35735.2	423099	340559	186798	243806	positive
187	212.1	540.14	272648	NA	221119	2E+05	192674	233915	195282	237709	220033	291238	294540	231283	159542	236758	positive
188	104.07	671.17	51459.8	184775	73302.8	2E+05	33345	278786	121899	130176	145782	90328.3	135847	88506	75344	92496.9	positive
189	233.11	724.4	23155.1	293812	42142.7	1E+05	14672	90788.1	118392	99464.5	79747	27969.5	60671.4	35458	121649	118667	positive
190	243.18	238.02	233157	301622	104251	2E+05	221876	95629.4	173535	54165.5	68480	76280.3	170094	76731	130411	186879	positive
191	265.2	249.07	25286.1	36879	15883.8	19161	19909	9689.59	20103	4620.02	7768.3	6322.91	16509.9	6800	11983	15826.5	positive
192	113.06	598.74	21045.9	82104	36184.7	83539	75254	87936.5	72977	168201	321853	12410.5	243093	149013	233485	167819	positive
193	149.08	599.78	NA	3968.7	2700.28	5264	4750.1	6660.72	5814.4	14322.6	25696	NA	16649.9	13023	18188	12464.8	positive
194	230.1	790.21	130592	132513	161393	63330	81911	106474	58904	NA	127528	365602	264291	146956	148307	127264	positive
195	244.15	464.94	18191.4	62064	27952.4	61562	26711	111637	91012	173495	363045	131762	206517	142372	247633	216322	positive
196	162.06	434.37	73487.4	17148	25701.7	21281	43085	54990	49056	47125.5	44744	360260	67716.1	62745	90520	35032.4	positive
197	290.15	875.61	14889.1	328926	83822.1	2E+05	30596	252380	179876	333898	213710	122933	192788	142731	138011	273299	positive
198	316.21	257.3	76511.7	65260	159005	1E+05	109655	49498.9	171806	44469.2	63020	63781.5	82405.3	57172	92429	NA	positive
199	132.1	355.1	12897	177669	33995.6	3E+05	24614	13694.1	61364</								

peak id	Mass	RT	1.mzXML	2.mzXML	3.mzXML	4.mzXML	5.mzXML	6.mzXML	7.mzXML	14.mzXML	15.mzXML	16.mzXML	18.mzXML	19.mzXML	20.mzXML	21.mzXML	polarity
208	133.1	1091.3	12023.1	71925	34811.4	91971	17247	56395.6	85023	73596.2	58911	223820	82226.4	36779	70378	59863.7	positive
209	184.07	778.96	222576	36538	17852.6	36233	22901	30295.8	44176	64671.3	19575	39009.1	48435.3	30096	33302	26297.4	positive
210	246.17	363.12	21525.3	96710	36540.1	50285	26047	208929	65910	121439	207040	148698	72290.9	119633	52765	66721.4	positive
211	272.19	427.81	102511	138024	75158.5	95631	206879	71003.6	147350	96095.4	123398	49678	53418.8	113305	119909	153456	positive
212	136.05	562.23	8041.43	37826	8592.04	22536	14633	34159.1	15223	88246.7	128606	205248	113492	130917	60751	72673.2	positive
213	215.02	892.61	5812.57	50784	5601.19	13047	21245	84510.1	5895.6	4068.73	3695.1	4537.12	5754.17	4015.6	1612.6	3411.87	positive
214	186.11	653.85	720.19	6445.6	2010.43	1912	4921.8	5433.96	3936.8	14364.7	196409	12162.3	14750.4	64926	193749	11763.8	positive
215	189.07	655.98	12058.7	35436	24702.3	90032	31858	49673.8	43101	83332.6	74354	144908	43160.9	65741	105266	93473	positive
216	222.1	657.14	1628.21	7735	2395.56	12887	3421.8	8045.85	7185.8	24716.8	27772	37264.6	20914.3	23416	22658	22780.9	positive
217	287.22	218.04	73193.7	66531	69265.5	1E+05	65374	78698.5	47852	63920.4	57330	31660.7	94813.9	34979	33879	45767	positive
218	187	847.51	6180.81	21719	23174.4	29008	30093	88676.7	19574	20831.6	7068.1	8707.93	8260.49	7980.8	9163.5	8240.47	positive
219	158.15	1016.3	80021.2	149342	80839.1	1E+05	93105	86660.7	143885	48700.1	65377	43529.5	65321.8	41814	52271	69355.4	positive
220	241.15	587.62	14959.4	34047	14969.1	23405	14022	53376.7	43623	166592	122230	109859	126918	150726	116756	107050	positive
221	385.13	705.89	79433.8	62699	91613.7	2E+05	133436	93581.1	85056	55928.9	54698	92373.2	33336.5	43396	74905	47431.4	positive
222	494.32	253.73	10409.6	19895	34451.3	39289	82674	53564.5	51289	111983	102527	88353.9	79110.3	81972	111063	102873	positive
223	262.14	869.48	7827.98	121026	35377.6	1E+05	13913	112201	70128	163711	78110	52345.7	64470.6	59857	52341	97932	positive
224	202.07	593.8	12922.6	91239	50292.1	97372	48336	78533.3	65251	21618	158103	85573.6	131010	160641	70315	77123.5	positive
225	163.13	246.58	64541.6	76828	48329.6	87002	35670	87381.7	37774	45861.9	26701	44183.2	53855.4	34209	27655	42021.5	positive
226	752.56	208.44	20860.7	6854.1	152554	8010	136690	16894.5	114481	13589.7	71206	38957	65090.6	43627	41548	27846.1	positive
227	116.07	436.2	13903.5	31995	30008.8	54838	19386	68598	69896	71216	70700	56342.8	65215.6	61468	152305	100771	positive
228	85.028	755.49	22928.1	52778	33970	26500	28466	31888.3	56785	108468	52099	32249.7	NA	29431	125653	149285	positive
229	191.05	506.97	146433	122985	68209.1	86965	15898	14433.3	113320	138750	88770	1183.9	63288.9	15020	145963	127345	positive
230	399.14	804.66	55063.2	63839	71452.8	64757	32345	53417.9	64797	29336.4	145386	30133.4	47295.7	90238	44338	46779	positive
231	182.05	665.05	4380.06	37437	13370.6	20531	2771.1	61625.1	37065	28852.4	23208	17777.1	4749.43	23936	13394	13136.5	positive
232	346.22	260.61	86170.9	105219	37379.1	68395	32879	64102	62773	13111.7	21848	15772.3	23326.6	15724	23930	37835.3	positive
233	390.25	244.98	7582.8	9009.3	5671.81	7163	6572.6	6281.88	7764.7	NA	NA	NA	3103.19	NA	4099.9	4166.27	positive
234	654.33	206.47	36999.3	20582	34869.1	76279	26360	46540.5	23283	54892.6	58520	47190.5	43957.9	24750	34898	49349	positive
235	247.06	699.35	27357	104125	41044.7	1E+05	24311	87985.6	75029	105908	93658	89003.2	86673.7	92906	77571	92304.8	positive
236	173.04	670.91	20836.4	101162	48553.6	1E+05	49312	69231.1	74419	115919	106415	71475.4	137265	65596	72763	65376.9	positive
237	169.06	784.68	76790.7	77511	63837.7	61249	136259	72005.1	95651	82776.6	87977	85254.2	92489.4	85068	77599	74199.1	positive
238	335.07	816.23	9319.37	17994	7607.43	12700	5473.2	22847.4	19116	25997.1	79998	134649	25365.3	53507	25686	19185.2	positive
239	136.06	819.39	3550.04	72367	8800.44	28418	2183.4	26522.3	18180	38072	41894	22824.3	32464	36784	29547	28438.1	positive
240	189.12	685.37	9343.31	47002	25584.8	46381	14881	51401.9	36409	NA	70121	123320	81835.1	64555	NA	57648.9	positive
241	239.15	285.95	42778.7	48996	28680.5	35625	28576	85327.5	41958	47289.6	46041	30405.4	43022.6	19700	28546	30523.2	positive
242	245.08	574.81	22952	118168	17480.3	76584	21186	82774.6	50191	78872.3	61436	22362.3	74261.3	22034	50735	57330	positive
243	241.15	635.5	9347.78	27809	10896.5	14568	6172.8	35544.7	20203	95554.3	107049	116489	107708	106409	66378	72445.3	positive
244	241.15	681.14	11744.3	39321	15509.2	17395	5452.5	36833.6	21777	111859	102931	116113	116373	110957	81352	92311	positive
245	153.08	715.4	24750.7	44639	44450	78378	36829	35077.4	45513	91741.2	87755	99240.6	66422.5	66606	68428	114980	positive
246	147.05	685.83	8810.23	18064	20195.2	39843	14452	34805.6	13507	53190.1	91340	57855	36567.9	114807	34926	72875.5	positive
247	206.05	754.64	112787	24539	37381.4	29538	40243	43293.1	48592	42478.7	29641	36566.9	63036.9	35895	53335	30071.6	positive
248	172.13	684.03	3772.73	108789	2102.62	2037	26623	21786.1	7001.8	7719.26	12984	12226.9	9716.43	28907	19591	18629.6	positive
249	247.18	1084.1	8184.89	40463	21143.3	51775	11140	45451.7	39374	83500	73414	107105	104020	63461	63400	75881.8	positive
250	271.09	542.11	15259	NA	8663.32	21578	17171	42529.6	24210	32453.9	35871	51703	12881	27593	49692	23530.9	positive
251	267.06	575.61	33329.6	71065	26660.7	45755	29911	71615	28220	62350.7	65226	36317.4	68905.7	22266	26506	29155.1	positive
252	148.1	669.06	6236.61	55205	18432.4	32494	11919	26724.2	40954	50208	41396	55877.6	40381.6	32053	28762	20966.8	positive
253	191.1	739.42	6330.75	34253	39906.5	16935	7320.3	46068.7	37917	13525.4	19846	13555.2	18622.5	21179	17154	27356	positive
254	241.2	520.12	67078.1	93174	77584.5	90672	58852	101211	68955	86912.7	95580	81937.5	101418	96923	62492	66162.1	positive
255	166.09	645.45	3584.96	60115	8383.89	22418	7944.9	34142.3	8663.6	47285.6	31997	33766.4	78754.7	43981	76063	99830.1	positive
256	599.5	194.57	10974.3	6052.2	50590.5	5616	99824	16551.8	34801	1299.5	22650	33934.4	9943.39	33705	22500	15987.8	positive
257	189.13	1278.7	4181.73	43062	12946.3	33725	24668	13684.8	20874	26974.6	41796	78984.3	99616.7	59743	52688	61039	positive
258	298.19	1040.3	12808.4	78652	22393	85748	17092	64507.3	66569	54257.2	42807	42293.3	42740.9	36703	40845	45385.9	positive
259	487.21	1043.8	1741.8	18265	6160.88	15288	3810.5	10978	10130	7009.81	6760.2	7500.9	7875.8	7313.5	5754.7	7488.24	positive
260	489.11	767.25	62603.9	78402	58986.1	81385	17327	90076.4	98531	46552.1	49466	39119.9	81950.1	48840	65739	72087.1	positive
261	115.05	440.8	15422.1	NA	10836.1	65819	37250	97324.2	63341	41164.3	49772	73584.4	26730.2	65854	24699	53736.7	positive
262	298.1	365.69	95513.6	17970	12554.4	30856	3639	32152.6	15791	36697.8	45745	6330.38	23182.3	36343	26968	26799.5	positive
263	283.17	277.81	37481.9	30935	30781.7	32604	33395	93692.8	24907	35432.2	30703	21528.4	31184	13346	33544	36591.8	positive
264	330.07	748.6	56771.2	71351	65616.9	65979	25025	65016.4	75792	44957	60681	27471.7	45208	57412	NA	51716.3	positive
265	178.05	497.62	2148.71	4777.3	4018.62	7029	10164	62031.4	7480.6	70954.8	60463	92982.6	43414.8	51096	46338	37704.4	positive
266	540.43	198.79	20840.4	2361.6	12385.5	27142	15873	32191.8	44377	26781	47347	84418.4	60786.1	92468	65391	51780.1	positive
267	220.08	740.93	7850.82	43998	25204.9	36943	8299.7	40777.5	46467	66883.2	33318	37944.3	25361.8	46490	56583	38992.2	positive
268	163.13	267.54	21055.6	18462	39710.8	24123	16524	21086.8	12671	16671.7	17958	20335.3	20696.2	18041	13205	23513.2	positive
269	274.09	719.56	23980.5	28548	12092.7	36667	13830	41436.8	27527	84319.1	58225	90152.8	62345.8	44619	51236	55332.4	positive
270	242.64	854.94	20642.5	64017	27947.1	54025	12268	65254.4									

peak id	Mass	RT	1.mzXML	2.mzXML	3.mzXML	4.mzXML	5.mzXML	6.mzXML	7.mzXML	14.mzXML	15.mzXML	16.mzXML	18.mzXML	19.mzXML	20.mzXML	21.mzXML	polarity
279	189.13	1148.5	2476.41	19697	9262.76	15701	10542	23254.3	17575	29622.4	24275	39756.9	19173.7	16676	32424	27404.7	positive
280	243.65	856.05	NA	20092	10985.7	26584	3856.9	19008.9	20270	75330.4	69625	52622.9	61966.2	34587	21907	37379.3	positive
281	134.04	852.56	15102	53317	20147.4	73949	13167	54267.1	29095	56765.2	54727	18711	56386.8	28582	44814	43137	positive
282	291.08	852.66	10008.2	40661	14666.7	54118	8646	47943.5	21829	40150.2	40018	11161.2	38948.8	20097	30352	31270.4	positive
283	159.07	228.11	18737.9	25538	21821.1	21331	10183	9520.27	23708	11711.6	7672	26545.4	74565.5	3237.1	5797.3	NA	positive
284	791.56	196.82	65647.1	20308	65382.2	20027	41123	71345.6	40766	32037.7	27753	24289.4	16122.5	39187	30310	30813.7	positive
285	432.28	257.59	NA	11454	NA	16004	43399	70516.3	NA	25452	21434	10905.3	11430.4	10026	17691	21052.8	positive
286	440.41	213.47	30363	5573.8	18233.8	38350	25252	35554.7	26436	24695.3	37512	35135.5	39029.8	67809	35419	35031.9	positive
287	144.1	669.78	4400.68	16050	11118.7	13157	2154.5	17040.8	26171	42967.1	63975	67395.9	53678.5	45211	58607	51299.6	positive
288	288.14	667.55	5730.2	4628	1432.69	1735	731.85	2205.36	2101.4	8368.28	14112	18490.3	9494.99	7285.2	5579.3	5898.7	positive
289	228.11	757.31	20229.3	16384	37222.9	21362	6761	10520.6	9573.5	27588.1	23356	67144.3	35639.8	51524	21393	46379.1	positive
290	251.1	437.2	NA	15228	2902.21	12332	5503.6	39777.6	5032.8	33499.4	66396	36389.7	30679	53876	13513	30012.4	positive
291	266.14	462.8	3336.34	21012	7401.13	4706	1888.2	26171.6	16331	52835.9	65613	11882.4	11097	27912	12815	21788.8	positive
292	191.07	794.4	6543.05	24203	13516.6	24264	9807.6	19409	11641	64196.9	52109	26221.8	36334.8	37640	43189	47136.2	positive
293	250.05	1131.1	41800.9	42633	40837.4	46966	44756	58265	46661	52915.3	55420	29519.4	63999.2	61267	39798	49820.6	positive
294	313.06	853.56	9127.03	24612	14419.3	34899	15383	38998.7	21306	19525.6	31850	11994.9	20042.5	21121	12904	17757.1	positive
295	283.02	839.15	32746.1	44909	31489.6	42320	21139	1563.31	41201	55232.8	29951	3430.85	62583.5	4370.1	50137	56844.4	positive
296	291.7	1332.7	45320.2	62004	17083.5	34370	29335	31402.2	24087	28403.9	33558	2323.71	6756.77	32120	27210	30294	positive
297	599.39	216.31	8619.44	751.86	7169.68	26044	23033	15299.1	25406	15214.3	26556	50047.5	46177.8	61823	45217	48329.3	positive
298	158.15	235.18	39037.4	35766	31314.9	37112	20793	24908.7	33411	20669.5	12130	17112.3	26018.5	12467	9814.2	12061.2	positive
299	202.14	582.43	2431.78	8502.8	5903.97	2098	5886.6	10931.9	3894.4	7779.07	12210	6280.24	16612.7	19785	15097	12145.7	positive
300	97.028	800.71	9850.49	22223	19665.3	31194	18442	34392.4	33273	NA	5361.4	2905.48	17227.4	3694.8	10474	12397.8	positive
301	375.11	851.61	NA	16283	1322.68	59058	3495.8	5421.01	8050.7	9649.27	6420.7	NA	3938.5	2433.5	3184.3	10502.5	positive
302	265.11	1184.3	2397.08	7880.3	3604.21	16107	3264.1	6654.01	7772.9	32636.7	24037	32304.4	21449.1	17575	35873	20533.3	positive
303	105.1	1121.4	3533.96	6688.1	4516.73	9863	5436.6	22955.3	7646.6	11475.1	17175	57513.2	13561	18987	6952.5	13267.6	positive
304	116.03	788.13	31974.8	19571	16386.4	31064	7289.8	20881.4	10806	NA	16331	56611.5	NA	14688	24993	16401.4	positive
305	371.23	263.2	17053	7245.8	13652.6	8120	15630	39745.9	10573	10923.7	10618	5147.56	7170.58	6336.4	10486	12331.6	positive
306	234.16	493.28	3110.85	14278	8521.95	4852	5784.9	19175.4	15514	17870.7	25350	4777.21	20992.5	28794	4315.2	16086.3	positive
307	95.06	758.68	55278.6	16044	46376.3	54270	27303	28486.5	20371	17892.6	23538	26023.3	23999.5	21281	25598	24780.2	positive
308	351.16	718.68	3040.01	44576	7425.39	10650	3235.2	25385.8	16033	NA	47320	53096.4	33116	48753	54623	48639	positive
309	119.02	662.07	5752.66	38094	22091	25964	13478	33555.7	19144	34567.6	21115	20336.3	51106.9	43784	41597	39768.8	positive
310	188.12	888.46	8137.68	23726	10457.9	25794	3977.8	35979.7	18910	22895.5	26915	24265.8	20931.2	16685	18093	25838.2	positive
311	375.22	888.59	3154.82	8951.2	3903.19	9795	13915.6	8257	9865.35	11464	8683.26	7229.64	5972.3	6906.1	10500.6	positive	
312	788.54	195.82	24728.6	13985	34276.3	14150	26025	31162.9	32551	33742.8	25044	41988.8	15120.2	45989	40744	35290.9	positive
313	814.56	195.38	23006.7	6688.4	21228.6	7385	14780	21191.4	30667	12109.2	16485	13237.2	9284.61	28386	25128	21035.4	positive
314	813.55	195.8	11489.2	8234	18241.3	5393	9948.9	15425.6	16728	13067.9	11806	7997.79	7724.72	18239	21927	15239.5	positive
315	140.07	634.47	10586.5	14134	6619.78	7144	9553.9	18944.4	14017	9106.62	18367	51592.2	31571.1	10416	17365	10737.1	positive
316	124.05	376.66	46079.9	29701	20655.6	43382	9219.9	30843.8	20646	21506.1	15179	15208.8	13173.2	13249	13000	11640.2	positive
317	292.17	635.75	3764.78	5070.9	5577.14	6482	5142.4	5127.47	5283.1	11338.5	37448	4307.4	NA	21102	18438	47329.4	positive
318	575.5	196.17	8511.12	6923.4	18592.3	6827	NA	19615.1	20234	19973.2	23110	23649.9	14689.4	46638	34841	33887.6	positive
319	601.52	197.5	8008.01	10743	9102.76	4549	7261.8	10081.4	11467	10040.7	14278	16473.3	5843.04	17343	16569	10098.3	positive
320	630.56	197.38	NA	3167.5	3738.47	NA	NA	3745.99	5633.2	8020.96	7869	4600.18	4344.63	8629.5	8658	6696.61	positive
321	104.11	412.96	32934.3	21044	31060.1	45120	23233	35411.8	21060	31642.2	31711	27166.6	28062.5	33206	44450	36161.4	positive
322	198.1	874.21	18120.4	37028	29230.2	44709	28042	37265.9	23253	34952.8	29296	38711.4	27090.2	28502	31166	38064.6	positive
323	442.29	207.65	6966.28	819.74	NA	17276	6594.8	5249.63	6271.7	10461.6	20108	16073.2	43931.2	40788	30537	35922.2	positive
324	569.33	207.69	3692.77	NA	NA	4630	NA	4348.53	4088.1	4054.36	6955.1	5744.22	9960.46	8275	7270.1	7788.16	positive
325	463.8	208.89	1702.65	NA	NA	3004	NA	NA	NA	2443.72	4956	2913.09	9906.4	6830.2	5363.8	6132.77	positive
326	880.59	199.9	13764.7	38368	27088.1	16885	8287.5	32031.8	20847	36895.4	43267	40171.7	17298.4	39768	37545	38897.8	positive
327	148	809.62	43463.3	28661	39582.7	26812	30941	30603.3	34616	23961.3	32447	32096.9	23322	34793	20036	29247	positive
328	432.27	606.58	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	43125.2	30260	30781.9	31120.7	23287	32270	33134.2	positive
329	362.76	264.61	2315.84	NA	4608.57	3179	41778	2383.41	20864	2566.4	6572.4	4393.2	6236.35	10624	7811.8	9646.36	positive
330	204.11	232.15	30596.8	15496	5382.73	28475	20043	40594.3	22550	25517.9	14646	34330.9	13056.3	12641	15719	NA	positive
331	124.05	423.1	32763.5	17027	27266.4	39793	13536	26789.9	30648	25742.4	18752	23814.9	23403.7	22386	15497	17343.6	positive
332	175	589.84	39760.2	24967	23349.4	32899	34495	29128.4	34149	29244.3	22104	26238.5	24694.5	29217	15055	18087.7	positive
333	186.15	625.83	1742.71	7158.8	2936.13	NA	5452.2	8048.83	3345	6549.35	7433.4	4531.08	6896.79	11347	11082	7893.71	positive
334	347.23	1026.2	976.18	7323.3	3034.18	9900	2462.7	8633.9	10675	10629	19420	28042.1	39649.7	16500	28253	18188.1	positive
335	262.05	753.38	32931.4	13314	15730.3	22951	9909.2	13528.6	17416	23065.9	22661	26039.8	29919.5	38886	21907	14554.9	positive
336	85.028	784.07	8380.47	19480	12803.2	15989	11575	14869.9	14224	29951.7	18942	15313.1	29092.2	10814	36295	38440.7	positive
337	107.05	818.43	3059.15	8506.9	8292.23	11649	6258.5	9872.14	9319.2	26295.1	17318	33563.4	10390.6	12672	21245	13643.9	positive
338	130.03	423.11	9348.71	NA	5503.32	2675	14880	6854.9	2612.8	7473.64	4042.5	10687.2	7874.61	6705.7	6788.9	6887.07	positive
339	249.07	847.41	3846.31	29530	9670.67	28598	6840.1	24774.6	12968	35146.6	29961	13816	23382	18260	18960	24375	positive
340	234.08	973.38	29676.5	20261	18555.1	25486	22484	23929.4	22076	18810.3	19038	22825.9	22610.7	21988	17696	20167.2	positive
341	343.16	764.2	20416.4	17277	24471.1	18571	18652	14426.6	20784	11741.4	17337	21969.6	25830.9	27166	12773	15063.2	positive
342	186.																

peak id	Mass	RT	1.mzXML	2.mzXML	3.mzXML	4.mzXML	5.mzXML	6.mzXML	7.mzXML	14.mzXML	15.mzXML	16.mzXML	18.mzXML	19.mzXML	20.mzXML	21.mzXML	polarity
350	150.08	808.64	3032.18	15044	10044.4	7938	4216.6	5465.66	7528.9	24678.6	21774	28370.5	21150.8	29010	18475	21590.1	positive
351	159.61	1117.1	380.44	4622.4	838.46	1912	753.24	1722.49	2310.7	15701.6	22614	8583.99	28887.8	15801	19987	18148.5	positive
352	97.028	757.53	5309.9	6846.2	9078.74	6083	2339.4	5612.53	3838.8	13613.6	8241.8	15299.1	21019.3	12240	16024	28266.3	positive
353	204.09	755.36	16862.8	11966	9208.96	13498	11453	11156.2	9024.2	16066.9	13642	28209.9	15021.8	11687	17365	13729.9	positive
354	269.12	579.34	7847.15	16324	10854.5	11041	7304.3	14876.6	21374	17795.9	12417	21057.9	19149.5	11363	3695.4	7511.64	positive
355	164.09	808.75	3739.97	26825	8649.39	8142	NA	7575.8	11305	NA	15564	14474.3	4525.3	13651	11196	NA	positive
356	134.08	771.7	10297.7	22929	21748.8	17683	15322	19912.6	13212	14058.9	19006	24767	23869.5	26626	23548	22969.5	positive
357	255.06	806.94	5763.57	6190.2	3239.24	14880	NA	6612.79	3299.9	5145.06	7632.8	26345.5	NA	4317.2	4454.7	3870.91	positive
358	88.039	839.31	3163.52	8099.9	3013.1	10910	5040.4	7515.6	4701.3	7868.31	14713	25600.2	8154.11	3981.3	20077	6214.84	positive
359	221.15	950.05	1286.31	14978	3635.05	10302	1994.4	7691	7101.8	25018.1	15223	15417.9	20310.4	16773	14050	14237.4	positive
360	221.15	958.69	931.65	11588	3383.63	8767	1994.4	6359.01	5673.4	24555.2	14060	15110.4	19709.3	15603	13293	12983.4	positive
361	170.08	464.19	1981.21	4176.8	1415	2809	2029	5561.41	5217.7	11007.3	13226	24532.1	9669.23	14771	6713.7	12794.6	positive
362	144.07	532.03	7299.89	23506	11216	11875	7918.3	10701.3	23041	11757.8	22014	17640	17535.8	23528	16472	13178.8	positive
363	114.06	813.72	3855.08	7755.4	3592.28	4206	1438.1	3747.08	7621.8	5529.57	5898.2	12376.5	15816.4	14265	15547	5091.08	positive
364	572.3	217.17	NA	2742.1	NA	3295	NA	2798.79	NA	10067.1	14136	22293.7	3239.85	10492	21588	12840.8	positive
365	221.08	807.74	3351.93	5942.8	7179.77	10966	3724.6	6673.84	6350	NA	20929	13230.8	12629.8	14162	14415	NA	positive
366	295.23	218.49	20964.7	6469.2	10400	19936	10862	16008.3	8182.2	9332.08	3952.7	6404.47	2936.82	2887.1	6429.4	3575.35	positive
367	74.071	409.2	12189.4	11686	9860.44	20864	5806.2	19978.3	5989.4	8890.23	9805.6	8769.03	8860	9030.8	11650	11930.5	positive
368	163.06	286.34	11619.2	2073.1	7920.4	2932	12230	9013.12	6604.2	11886.5	16827	20593.6	8773.52	12252	7883.8	8815.23	positive
369	362.28	222.53	2520.03	9612.2	NA	8872	4251.1	10112.5	6274.6	17318.6	12314	18009.8	6512.65	13494	19326	16094.5	positive
370	313.27	207.67	3059.44	8484.7	4670.2	6067	8740.2	5153.27	8942.2	19031.3	7629.2	14126.9	4092.38	8718	11566	11411.3	positive
371	112.05	789.43	17845.1	13459	9361.69	11030	5670.6	12273.7	11687	18414.5	15887	11894.1	15263.1	11058	11748	10450.1	positive
372	309.2	983.44	9328.31	8466.6	6927.64	5733	12593	10559.5	9877.1	9348.88	8770.2	12388	10164.2	11651	9516.4	9563.91	positive
373	279.23	213.09	8655.71	2011.5	6658.23	7108	14944	12156.5	9404.3	13314.3	6626.5	17547.8	7223.53	8116.4	7486	5810.09	positive
374	114.05	536.75	6794.8	6688.8	6235.17	8587	5989.6	15354.4	8199.4	13551.5	16129	17425.2	12893	11346	16334	16934.2	positive
375	342.24	542.36	NA	2035	939.36	2186	696.48	2061.37	1349.1	12588	13749	10050.2	7809.92	5718	9734.5	14625	positive
376	144.1	295.47	1158.06	2196.5	2212.6	1986	3830.8	2081.73	1883.8	7150.28	17192	10156.3	7402.19	9261.2	4868.5	5265.92	positive
377	244.15	364.51	670.19	6787.1	1822.22	5828	1830.4	8104.88	2305.8	8632.91	17154	6862.71	10660.7	2451.6	5142.1	8784.83	positive
378	298.1	806.14	8647.67	17114	11370.7	15943	3105	6400	11597	10277.4	16910	3130.93	10707	9173.5	8351.3	9188.92	positive
379	195.11	537.75	626.37	NA	1287.69	1151	971.65	5302.24	1500.2	7756.86	12330	10189	17083.5	9660.5	9139	15759.1	positive
380	185.07	753.57	8777.69	11332	7489.29	9684	5261.5	NA	12690	15623.1	10010	12500.7	16707.2	15001	16967	12553.4	positive
381	290.17	753.82	NA	6962.1	NA	NA	NA	NA	NA	9080.82	11270	11940.7	13095.8	8590.9	16826	14770.7	positive
382	307.04	640.97	16735.9	7650.1	10140.4	10364	11158	10293.5	7122	8706.74	12375	14583.2	15781.7	16564	3508.1	5212.95	positive
383	299.26	206.71	8032.29	2697.5	6310.84	9624	8549.2	12819.8	8050.5	9768.92	9400.8	8583.09	6522.7	12855	6849.9	9319.8	positive
384	239.14	436.79	13044.1	6748.2	7834.06	7315	11331	8198.98	6835.5	6897.95	8217.5	7968.53	7723.36	8665.9	5228	6092.78	positive
385	444.03	878.03	6269.04	16654	8370.87	10362	925.62	8071.06	8358.8	4414.29	7403	1933.1	6417.81	3706.7	4275.4	4860.2	positive
386	330.07	860.49	5200.06	13511	8951.72	9704	5533.9	13309.6	16477	8923.2	13168	7352.1	6753.57	13081	5081.7	7366.35	positive
387	168.07	660.45	1106.61	4323	NA	6243	1675.3	2996.48	4442.9	11935.9	14159	16450.2	12051	11545	11288	11897.4	positive
388	493.29	206.4	3188.36	16263	2080.95	9338	2670.2	10047.3	6471	15342.3	7788.7	11706.6	2461.71	7910	12083	12678.6	positive
389	325.18	1109	15736.2	13485	11160.8	11606	13945	11331	13193	13253.8	13943	2421.36	8902.5	13560	9945	9839.12	positive
390	168.07	465.13	3048.57	9357.2	1535.07	6544	1721	2325.41	4297.6	6097.13	6143.1	2406.38	4652.94	3986.5	3485.5	5798.62	positive
391	277.15	677.46	NA	4511	NA	NA	650.89	1554.04	3454.2	10261.6	7621.4	13954.2	6496.25	7433.7	2063	5218.99	positive
392	198.09	595.06	9890.69	5259.9	9059.98	9424	3104.5	13582.4	9641.8	6226.12	NA	8307.13	8987.69	6809.5	5603.3	6094.16	positive
393	240.11	814.2	NA	3122.7	NA	NA	NA	NA	NA	6607.54	14192	7903.35	14000.9	10117	6497.1	13255.7	positive
394	193.13	1053.7	NA	2610.2	844.22	2767	614.81	1987.81	3262.3	10559.5	14089	10336.6	9397.26	6648.9	4053.3	6649.55	positive
395	290.21	1054.9	NA	3630	995.8	1420	853.63	1717.55	1553.9	6310.83	10305	10788.4	12299.5	5537.1	9848.6	9755.09	positive
396	347.17	855.63	1335.34	10591	3834.06	5417	1142.9	10330	5774.9	6991.76	8140.3	5087.16	4707.73	6364.4	4618.2	4840.21	positive
397	78.956	1086.1	8008.9	8194.4	6862.33	7736	8217.4	7506.86	7885.6	7979.6	10595	9081.45	8196.95	8037.9	7510.6	8146.46	positive
398	144.93	1065.4	4748.87	4966.4	4873.86	5411	4610	6316	5115.9	5377.05	7936.5	5341.14	4453.23	5164.3	4573.4	4813.97	positive
399	172.07	812.3	2115.31	3748.3	2124.99	10542	NA	3778.02	2580.9	4451.22	5247.1	4578.53	3530.53	3535.8	2625.6	3568.15	positive
400	440.36	222.03	2053.22	1848.9	4065.58	7036	10495	6649.35	9396.9	3501.73	4084.1	8062.62	9676	9141.5	8886.1	8969.31	positive
401	206.08	479.24	NA	3263.3	3253.05	4751	2321.8	10452.7	4846	NA	7498.3	NA	NA	9302.2	NA	9138.67	positive
402	358.2	1166.1	980.99	8066.1	5451.65	7386	4079	5646.05	6292.6	8448.57	9001.9	7486.84	9997.45	9176.3	6044.3	6789.6	positive
403	176.96	816.94	4400.6	7020.7	5412.33	6648	6415.1	6917.7	8835.4	4954.75	9644.9	7945.55	5808.67	8774.3	5779.7	6938.17	positive
404	246.24	20.05	8706.13	9128.7	8738.91	9210	9348.7	8201	9144.5	8909.09	8559.5	9242.5	8926.92	9275.8	9251.7	8666.23	positive
405	78.956	1140.8	5637.3	5954	5471.93	5861	6447.6	6102.33	5398.1	5189.4	5580.6	9081.45	8196.95	7270.3	5116.4	5212.89	positive
406	286.11	657.5	532.83	6429.6	2386.68	3891	1116.1	3566.07	2636.3	6722.95	6455.4	5750.72	7196.09	5681.5	3740.2	4901.72	positive
407	297.24	213.8	4445.18	1520.1	5322.55	2506	5039.8	8276.12	6685.8	5317.09	3894.6	3150.96	3341.66	3110.7	3021.6	2326.72	positive
408	303.24	1353.8	208.19	3375.1	864.7	5492	NA	3934.11	5271.2	8168.32	7180.3	2348.94	3748.09	3524.1	7274.3	8265.37	positive
409	218.21	69.54	6901.73	8185.6	7532.01	7652	7430.2	7215.49	7579.7	7659.64	7700.3	7378.87	7335.13	7394.3	7023.1	7220.06	positive
410	142.94	910.29	3800.24	4745	5403.22	5710	6364.3	8054.97	7561	4898.47	3960.3	7012.08	4190.33	3100.1	4271.9	4874.27	positive
411	84.911	1085.2	6101.69	7241.9	3683.6	3862	5440.9	4756.62	3476.5	4471.98	4502.2	3248.05	2647.48	6140.7	4445.5	4463.99	positive
412	549.49	196.59	1462.07	1806	5448.88	1407	NA	5783.57	5544.6	4236.89	5255.8	2973.48	2068.09	46			

peak id	Mass	RT	1.mzXML	2.mzXML	3.mzXML	4.mzXML	5.mzXML	6.mzXML	7.mzXML	14.mzXML	15.mzXML	16.mzXML	18.mzXML	19.mzXML	20.mzXML	21.mzXML	polarity
421	184.17	376.22	2085.86	5186.3	2109.34	4923	3952.7	2814	3763.5	2679.9	2522.7	1865.11	2234.63	2761.3	5109.2	4887.79	positive
422	89.024	592.4	2523496	1E+07	7822150	1E+07	7E+06	1.1E+07	1E+07	1.8E+07	2E+07	5900993	1.1E+07	1E+07	2E+07	1.3E+07	negative
423	221.01	592.74	1621.12	12672	7366.45	17699	7623.6	18869.1	17808	21465.5	26343	7136.82	14115.7	18216	32437	38857.2	negative
424	128.04	601	94696.2	537948	198144	5E+05	235152	591390	489303	2485833	3E+06	4726568	1752095	2E+06	2E+06	1984993	negative
425	124.01	809.38	2247716	5E+06	2732585	4E+06	1E+06	3951774	3E+06	2878908	3E+06	2996014	1827142	2E+06	2E+06	2583687	negative
426	249.02	808.56	230524	737592	383723	6E+05	103726	583379	356975	343369	426696	346735	167161	243488	249286	271506	negative
427	145.06	784.44	301448	3E+06	1705034	3E+06	965940	2355099	3E+06	4302602	4E+06	4502748	3812339	3E+06	5E+06	3665006	negative
428	267.07	621.67	1254059	4E+06	2465252	4E+06	1E+06	3840695	4E+06	4388697	4E+06	1765762	3839580	4E+06	5E+06	4087261	negative
429	535.15	621.75	250188	1E+06	750464	2E+06	269603	1550338	1E+06	1908257	2E+06	414990	1427785	1E+06	2E+06	1564361	negative
430	557.14	621.52	9650.66	14289	14196	13522	8636.6	15437	13368	14353.6	14151	10013.6	11672.7	12816	13436	14360.5	negative
431	146.05	768.73	850385	2E+06	1360272	2E+06	515708	1996257	2E+06	4015623	2E+06	3536151	1880320	2E+06	4E+06	2702438	negative
432	306.08	750.09	NA	4E+06	943580	NA	667735	2210865	2E+06	2522903	2E+06	696169	2119905	1E+06	2E+06	1982437	negative
433	133.01	830.72	303838	1E+06	812593	2E+06	1E+06	2187518	1E+06	1749913	1E+06	3429871	1871193	2E+06	3E+06	1174884	negative
434	274.03	830.73	3487.47	69267	27575.5	1E+05	72737	116823	59243	106374	54402	178414	115457	73193	159130	59389.9	negative
435	159.01	830.36	592.25	4849	2135.61	9740	5825.1	9310.85	4830.3	9069.24	4438.5	15155.6	8828.2	6381.5	12023	4160.02	negative
436	88.04	774.43	255654	NA	1121969	1E+06	600143	1331092	1E+06	2036007	2E+06	2026994	3540427	2E+06	2E+06	2073586	negative
437	130.06	772.21	49600	985620	663808	8E+05	330016	722375	475081	1265353	1E+06	1210331	1561398	1E+06	1E+06	1232935	negative
438	261.13	771.38	NA	32223	14490.3	11959	6607.6	14480.6	5152.5	44936.7	51213	45365.3	107998	71041	49782	42072.9	negative
439	117.02	797.5	25375.6	2E+06	782727	7E+05	152905	962937	2E+06	2244496	3E+06	778003	2185286	2E+06	2E+06	2589045	negative
440	187.04	587.54	846617	2E+06	1738493	2E+06	2E+06	1997832	2E+06	1675135	2E+06	1175460	1720140	2E+06	2E+06	1717551	negative
441	925.71	589.04	1643	5060.5	3206.89	4230	3485.3	3687.86	3860.7	3883.74	2954.1	2195.98	3597.5	3901.5	3442.4	3537.85	negative
442	96.97	813.82	324665	864280	511489	8E+05	463806	1154869	908931	1138151	2E+06	1690289	1261641	2E+06	1E+06	1609986	negative
443	176.94	814.34	23963.4	120784	60474.5	87173	77214	200584	154396	185355	543360	474504	240428	560134	226650	351117	negative
444	292.92	814.14	1906.37	9869.6	3449.46	10498	6018.5	28076	14197	17047.7	86757	60977.8	23127.2	82414	19255	29117.8	negative
445	153	819.79	NA	2948	1659.93	2930	335.02	3541.22	2347.3	10949.8	10483	20025.4	12260.6	13088	16625	6704.89	negative
446	158.93	814.33	NA	1648.4	803.29	1160	878.48	2645.18	2277.9	2846.46	6708.5	7605.45	3699.91	8728.6	3750.2	4713.08	negative
447	130.09	606.78	68720.3	195902	121203	3E+05	243246	232870	260114	581740	501847	878785	290168	285750	1E+06	899479	negative
448	480.31	245.88	16713.1	18414	32458.4	41249	299529	93034.2	75247	1006394	570669	507509	479790	1E+06	1E+06	552719	negative
449	556.33	251.59	62923.5	103184	116181	1E+05	495302	260840	147496	886442	904363	479455	576028	1E+06	1E+06	742857	negative
450	541.33	247.7	NA	4443.9	6085.8	7036	46653	29994.8	11030	136068	113744	75323.4	53532	137495	156470	144172	negative
451	584.36	244.49	22890	9570.4	14778.3	14356	34609	32333	15866	61548.5	80675	28812.8	43053.2	75001	88818	61013.9	negative
452	524.34	248.24	NA	NA	663.11	1043	5354.2	3000.86	1167.2	18056.1	13439	10258.5	4609.12	15538	25070	18900.6	negative
453	554.35	248.61	536.92	1495.1	2481.47	1915	9879.2	5061.97	3077.9	15720.7	16886	8818.35	6981.06	17392	16760	14993.3	negative
454	259.02	807.73	201589	600369	309824	5E+05	130405	20018.1	272983	1386447	312078	12057.4	1438385	20345	1E+06	1246359	negative
455	164.07	580.66	53456.6	134499	143440	2E+05	169642	231949	235689	428006	317275	431392	181476	240635	799872	558845	negative
456	214.05	794.42	NA	282730	179902	NA	98789	159065	112867	1078218	722847	768041	1021116	576278	1E+06	689962	negative
457	175.02	787.65	974960	565443	411773	8E+05	561907	112173	594699	1167.72	103835	251195	66207.9	33803	NA	853.56	negative
458	96.97	778.98	31444	29233	43939.8	72499	68646	95586.2	79494	91238.8	53212	66383	91886	68956	88614	87694.4	negative
459	171.01	743.72	NA	461010	289908	4E+05	185595	198169	159577	782040	839681	1080016	945439	602425	829941	500641	negative
460	318.1	742.71	131918	283376	219694	3E+05	136830	128767	103509	473484	489788	668931	591460	415022	489376	282840	negative
461	197.02	743.47	NA	37105	23766.7	31575	16799	16287.5	13488	69669.5	70765	98080.8	73646.3	53036	71165	41856	negative
462	256.1	742.95	14946.9	35756	24049.5	37762	16991	15481.9	12211	64906.2	66704	93437.1	72950.7	50862	69693	37454.3	negative
463	242.08	743.19	NA	16766	9570.44	13769	6079.8	5736.8	4338.8	75240.7	45105	44848.5	77652.4	22904	78410	48737.4	negative
464	226.05	743.86	3467.38	7418.3	6239.98	8957	3776.3	3613.75	2712.9	14808.8	14254	22475.6	16762	10986	14266	8437.56	negative
465	230.02	742.9	1722.93	4408	3462.41	2855	2155.3	2445.54	1640.5	8002.62	7622.7	10921.4	10628.8	6632	6729.7	4182.77	negative
466	132.03	783.2	523421	641607	506662	1E+06	245879	709043	470535	226659	150106	657380	124437	200940	301310	131941	negative
467	111.02	575.4	167167	749927	336103	6E+05	291854	572552	424179	759622	512501	256192	548825	257398	731792	637426	negative
468	243.06	575.62	27285.5	144606	45448	1E+05	54062	121584	80978	168878	113666	46688	109583	45407	165727	136214	negative
469	265.04	573.92	5291.22	12967	7577.57	12710	7541	14277.3	8841.7	13096.5	11306	5451.38	9968.65	6377.5	11853	12254.6	negative
470	218.1	517.57	NA	234113	63299	73465	61214	219755	79678	249883	302541	698654	267163	347209	311835	255750	negative
471	281.1	513.6	2228.73	3080	2314.59	1932	2042	3565.16	1779.6	3417.77	4123.8	8886.21	3729.95	3912.9	3123.7	3449.43	negative
472	500.28	242.8	15663.3	9777.1	10303.9	21867	16566	10536.5	26579	111670	82176	52626	51883	47646	214343	133224	negative
473	180.07	715.65	30198.7	81384	67200.9	1E+05	73782	117728	110468	163664	160510	475480	102123	119527	330505	222909	negative
474	188.94	980.36	222808	301748	256864	2E+05	404524	398187	281601	397015	424607	327364	296956	396574	401977	376734	negative
475	228.93	982.33	139799	194990	158922	94669	261485	267733	181321	253458	282447	218590	196087	250138	264748	249193	negative
476	294.9	981.1	105588	NA	132678	79322	234608	237398	159694	231978	260314	182506	162779	225882	241925	226112	negative
477	334.9	981.64	89097.1	139808	104768	65707	190793	185658	129127	185588	199896	145963	130830	182132	187150	181271	negative
478	400.87	981.83	67702	110400	79538	46875	160604	161859	101969	150450	167373	119868	103634	151863	156949	148750	negative
479	272.92	980.84	55898.6	76845	68641	48063	94312	93198.4	73534	94520.2	101567	79741.8	78259.5	93150	93198	89681.3	negative
480	347.89	982.04	14143.7	26187	18656.8	9158	45422	44650.6	24974	43764.8	47994	30360.1	25864.2	43882	42715	43971.4	negative
481	367.88	981.94	6127.29	10563	7902.04	3708	21310	14890.9	11570	20603	22905	13190.9	10927.8	19142	20522	19421.6	negative
482	440.86	981.35	10247.6	15622	11535.5	6953	25457	24456.9	15581	23548.6	24407	19250.5	14120.9	24187	25322	25554.9	negative
483	506.83	982.14	9931.7	15364	12367.6	6626	25823	25001.1	15338	23322.6	22764	17882.8	15865				

peak id	Mass	RT	1.mzXML	2.mzXML	3.mzXML	4.mzXML	5.mzXML	6.mzXML	7.mzXML	14.mzXML	15.mzXML	16.mzXML	18.mzXML	19.mzXML	20.mzXML	21.mzXML	polarity
492	179.06	873.17	471346	456155	544604	5E+05	423401	425643	312274	442085	341264	518652	294805	376774	375196	433791	negative
493	664.12	678.15	NA	8068.1	2732.1	NA	3107.9	6494.37	9570.1	466120	551960	32203.5	478034	433009	371481	425141	negative
494	116.07	684.24	31953.3	85016	45580.3	1E+05	75326	84543	76266	193297	194220	242477	112873	103039	250737	229333	negative
495	600.33	224.72	15923.9	NA	8152.67	45956	NA	66151.9	11486	402817	303302	386421	149589	417725	400189	338868	negative
496	619.29	222.92	NA	NA	NA	18168	NA	59491.2	32037	188203	170838	314284	80433.5	175918	267731	171415	negative
497	101.02	705.09	26453.4	117763	52512.1	77782	34612	102952	84531	280072	408524	388915	338141	294185	390664	315974	negative
498	222.1	705.09	25863.9	111252	51574.6	72599	32945	95267.5	77094	257228	381577	338408	314167	279267	333158	284392	negative
499	262.13	705.43	NA	39433	7850.14	15594	3586.4	31454.2	22825	161003	295676	273107	236676	183085	271837	211244	negative
500	145.06	703.56	NA	3361.2	6257.47	3465	7649.5	1840	5553.8	34624.1	40442	16055.9	35363.2	35970	79110	57661.6	negative
501	146.08	705.33	1665.17	12315	4226.35	6612	2354	10735.4	8847	34407.6	54917	56561.6	47741.1	36465	57892	44736.2	negative
502	136.03	705.76	4650.59	8378.6	4546.49	7687	2560.4	8754.01	5432.7	6407.16	13057	16660.2	9628.6	12109	9680.1	9883.76	negative
503	220.12	704.64	NA	3417.8	1418.29	1915	866.82	3658.01	2625.8	9201.89	13142	11024.8	12091.3	9942.3	11423	9452.79	negative
504	383.2	704.82	NA	2748.3	725.32	NA	NA	2281.72	1358.8	6836.33	9381.9	6393.5	10476.5	9547.3	6147.7	6742.85	negative
505	225.04	705.35	NA	2106.7	1086.42	NA	858.31	1779.87	1411.5	5431.38	9413.3	9074.23	7802.9	7011.7	6768.3	282970	negative
506	130.05	705.79	NA	2375.8	1151.49	870	652.68	2224.28	1994.4	6969.11	9248.7	8894	7512.66	7084.6	8640.5	7150.53	negative
507	207.1	704.86	NA	1477.5	573.84	917.6	297	967.09	1132.9	3585.6	6278.6	4267.69	4887.4	5159.5	5554.1	3645.36	negative
508	184.99	846.16	NA	129777	98040.3	1E+05	89122	277120	93348	114730	54513	26324.8	67248.4	35795	63766	64266.1	negative
509	218.07	742.13	18818.3	123674	57456.5	1E+05	23870	89222.7	107575	394163	180110	124410	193650	114952	376915	282970	negative
510	228.06	745.04	5140.55	21067	8979.24	15275	11948	14981.1	11304	144278	68022	64722.2	35704.7	44456	83956	117752	negative
511	221.98	811.56	79337.4	303919	128539	3E+05	62032	391687	242092	209036	353732	378739	157569	283771	235781	240270	negative
512	145.1	1159.9	12454.3	107806	56733	1E+05	55404	90368	77622	162132	195951	281829	158449	104109	218357	192196	negative
513	245.05	1155.4	1764.75	6295.1	4855.89	8271	6050	6945.82	6618.1	7202.85	6995.4	7655.8	4623.55	5332.9	13680	11247	negative
514	236.86	1112.3	367405	364956	250427	3E+05	330420	348596	326520	353134	363738	30270.4	107495	319650	288648	324260	negative
515	374.77	1112.6	100732	91571	56620	63870	85220	96079.5	87706	85455.8	95417	2310.5	15892.6	83622	71842	87010.5	negative
516	238.86	1112.2	76285.4	78173	53605.9	58442	69418	74344.1	69075	74537.3	77821	6190.04	22864.7	67523	62354	70712.1	negative
517	338.82	1112.9	57797.5	54537	38366	42154	50217	54464.7	48096	53495.7	55859	2633.12	13165.8	47779	44561	50806	negative
518	436.77	1111.9	57570.8	56444	36763	41014	50512	54684.7	48385	54483.3	57252	1817.29	10234.4	48500	43501	48854.2	negative
519	292.83	1112.5	54302.2	51347	32304.6	35030	46279	51210.2	45351	47650.5	50585	1957.18	9174.06	43523	40954	44907.6	negative
520	474.73	1112.6	43066.5	43540	25445.2	27222	39378	44052.3	35649	42198.3	46832	883.93	5855.52	37205	32453	38084.6	negative
521	376.77	1113.3	33347.1	30959	19126.3	21515	29445	31890.3	26960	27477.6	29858	826.83	5186.05	25926	23728	29477.2	negative
522	260.91	1111.9	13456.6	16096	12039.4	12225	12997	13563	11732	15976.1	14759	3343.28	7013.65	14357	12436	12904.3	negative
523	514.68	1112.5	14658.1	12798	7760.58	8115	11285	12876.1	11625	12447.5	13775	245.11	1687.41	12254	10861	12174.2	negative
524	612.64	1112.4	13868.6	12635	7243.23	7701	12326	11729.3	10644	11576.6	13154	NA	1432.6	10625	9993.2	11168.9	negative
525	320.84	1099.7	11944.9	13053	11085.4	11424	13299	12765.7	11506	12472.8	11939	5342.52	9923.84	12825	11173	11248.9	negative
526	320.84	1100.4	11944.9	12220	11085.4	11424	13299	12765.7	11506	12378.9	11939	5342.52	9923.84	12825	11173	11248.9	negative
527	298.86	1113.7	12920.8	12914	9364.02	10452	11999	11670.8	10619	12600.9	12101	1998.98	4980.02	11169	10896	11625.5	negative
528	294.83	1113.8	11423.7	12748	7702.81	7695	10742	12037.2	10943	11069.7	12522	612.55	2386.52	10474	9914.0	11616.8	negative
529	358.8	1106.5	10367.6	10733	9982.81	9934	10714	10800.4	10736	10310.9	9719	2834.03	6239.08	10377	9210	10688.1	negative
530	276.85	1103	7912.84	6722.1	6200.49	6101	7401.9	7069.04	7298.2	6896.68	6714.1	2485.05	4737.02	7004.7	6509.8	6437.9	negative
531	536.73	1113.4	6856.92	7249.9	4860.93	5463	6926.1	7602.77	6227.4	6603.18	7302.6	269.11	1552.6	6423.3	5857	6256.67	negative
532	320.82	1112.8	6616.07	4637.9	3349.56	3527	4733.2	5811	4073.8	4764.34	5505.1	186.52	961.24	4189.6	5520.2	5060.72	negative
533	337.82	1112.3	5167.15	4944.5	3619.92	3990	4826.8	5514.14	4361.9	4556.19	5379.8	288.97	1410.08	5254.6	4218.4	5312.28	negative
534	134.05	544.07	NA	22375	16528.6	NA	2151.8	68001.3	38741	136197	134346	16816.4	106847	134277	116957	103407	negative
535	229.01	798.23	39563	109781	86470.7	1E+05	62795	185571	161425	161854	16173	6854.35	130799	12610	123464	108949	negative
536	131.05	795.41	15287.9	47072	44155.9	72664	27669	73028.3	48087	143059	120711	332065	122644	79889	227192	169841	negative
537	143.11	243.05	56176.3	138509	162046	1E+05	191463	136441	316722	149349	207154	176423	150204	213261	148182	253469	negative
538	203.08	653.79	NA	43985	39039.8	NA	41504	67877.1	57401	105442	94516	184491	54855.7	82721	170203	137994	negative
539	283.08	656.63	358.15	2440.5	1225.16	3312	1203.5	1701.62	2769.9	5287.43	5532.4	4884.21	4771.94	5462.6	4752.6	4327.85	negative
540	307.08	640.84	724.82	41499	11872.7	14115	15601	46245.1	32200	294310	265625	177609	213897	158484	259500	284150	negative
541	382.1	757.13	NA	290883	24574.5	NA	27287	208609	248678	167302	112047	78858.3	123648	75587	193882	88368.6	negative
542	205.04	866.97	1499.33	150743	33565	2E+05	14785	281351	152344	247379	218019	186825	86100.4	196693	153719	249496	negative
543	260.13	869.33	1300.5	8448.1	3239.88	6065	1798.5	8101.62	5286.7	11358.9	5297.1	4781.9	5040.52	4813.4	3309.1	6841.57	negative
544	242.11	869.15	1015.92	6780.1	2607.34	5831	1325.7	7709.91	4273.4	9729.69	4698.2	4246.5	4443.03	4437.6	3355.1	6113.98	negative
545	103.04	607.27	NA	167257	61833.4	NA	78435	62562.4	130637	102096	159700	41231.4	76970.4	51703	116260	146235	negative
546	174.04	773.92	251362	95236	239442	1E+05	110523	242681	179512	86289.3	106932	120264	158200	218956	211055	87895.5	negative
547	118.05	764.64	20270.4	43015	46293.3	67724	36967	69281.4	64477	107421	135743	226498	84803.6	94423	175993	128377	negative
548	245.04	696.51	74761.5	172388	95798.6	2E+05	83202	172650	174984	253817	265684	248417	214340	233211	222777	230624	negative
549	114.06	696.75	39826.6	73565	30832.8	64984	51682	66819.6	50854	99761.3	176852	260956	76140	71193	127242	138351	negative
550	104.04	818.39	10190.4	40797	34559.7	46133	24754	50618	38197	168330	88330	182911	61557.2	57504	138819	66586.2	negative
551	236.09	276.35	NA	23720	9331.65	24129	13438	38367.5	28776	82384.5	128696	102076	57261.3	103739	93885	81717.7	negative
552	282.08	699.68	NA	123411	63415	2E+05	49819	248023	183960	194226	162114	48586.4	128985	136848	611535	123381	negative
553	173.1	1248.7	NA	55190	23238.5	53673	39182	44865.5	54597	97038.3	104618	108909	77590.9	69456	176973	122136	negative
554	369.2	1249.2	NA	2180.7	364.09	1845	903.68	1276.13	2050.4	6692.6	8679.8	8427.25	4367.89	4170.7	14494	9248.	

peak id	Mass	RT	1.mzXML	2.mzXML	3.mzXML	4.mzXML	5.mzXML	6.mzXML	7.mzXML	14.mzXML	15.mzXML	16.mzXML	18.mzXML	19.mzXML	20.mzXML	21.mzXML	polarity
563	201.06	557.36	NA	20885	10292.5	10642	26384	36599.7	48036	88288.7	116079	70279.9	96080.4	95412	85318	100989	negative
564	200.06	557.44	NA	3949.4	2410.69	2273	5964.3	7721.78	12333	20159.1	28080	17337.5	23968	22646	19778	23417.7	negative
565	295.08	713.34	NA	39997	49518.6	82907	25519	43994.9	55122	130360	167080	173907	107305	144592	148802	173709	negative
566	580.33	246.75	NA	3636.6	6240.22	20666	40839	13192.4	16040	87669.7	93755	130419	50633.4	54434	157206	123613	negative
567	166.04	775.18	NA	143071	76815.5	NA	36655	91875	50840	134044	134126	152794	132112	85946	106765	108895	negative
568	124.99	651.71	21027.2	72378	20289.4	NA	10350	52506	25413	62348.4	57986	49963.7	21104.4	18104	35033	46257.6	negative
569	187.01	263.74	20195.9	144402	29437.9	77742	48332	57761.9	30051	43930.7	135780	36527.4	73317	1052.4	22909	48762.2	negative
570	260.11	685.86	NA	80479	83078.6	37457	4432.1	6425.23	62064	2960.9	7060	3365.46	6193.26	3432.3	8278.7	5604.92	negative
571	157.12	227.81	38785.6	142084	68047.1	53054	75731	77882.7	126965	68480.8	114487	111719	77635.3	90173	74920	55675.4	negative
572	696.15	671.37	NA	11134	5891.01	9165	4580	35859.3	23385	103959	141483	40441.7	100805	119343	60174	70971.9	negative
573	747.52	195.01	7265.93	NA	41150.3	12247	31863	36101.4	86942	29138.2	25996	19074.6	19434.7	29432	41028	50130.5	negative
574	306.08	872.69	11820.7	138424	61150.9	99651	21224	69015.5	84219	96271.2	116707	41231.5	67638.7	99879	79454	112013	negative
575	136.03	590.1	6897.18	22492	8843.83	NA	32644	109094	33746	118275	116477	135582	51741	105842	100617	112420	negative
576	101.02	757.82	7856.26	72378	27455.3	20084	112380	136285	84448	70252	32917	30957.6	83387.1	20464	80150	83702.1	negative
577	308.1	720.12	37467.3	31993	15686.4	43412	24198	43881.4	43127	120129	36367	102039	45641.8	33034	55595	45575.3	negative
578	129.02	796.51	29378.9	47178	35959.1	68512	40942	95958.5	46327	72199.7	94301	24637.4	56428.9	43092	76157	122266	negative
579	74.025	618.94	1321.16	2638	1948.57	2155	1103.9	4427.92	2867.6	3854.41	3149.8	4933.97	2127.55	2409.5	5267.5	6385.15	negative
580	126.02	625.15	NA	2756.2	1767.64	2032	894.77	5263.28	2804.5	2428.91	2925.7	5930.29	2086.07	2501.6	2186.7	2706.41	negative
581	144.03	623.97	NA	5665.3	3607.34	2834	1648	8306.5	4453.3	4102.33	4831.1	7548.04	4059.84	4778.3	3879.8	4436.72	negative
582	283.26	414.94	80332.6	87328	105858	91700	105116	92163.5	91872	96318.8	99584	99117.3	88906.3	108210	119751	97262.5	negative
583	311.17	405.95	20066.2	31608	26869.5	22566	26691	22477.4	25905	21810.8	22216	22807	21316.2	22920	24930	22596.1	negative
584	265.15	205.04	18646.6	44310	117037	11798	60653	32903.5	32503	34659.1	19876	26580.2	10418.3	24175	16129	16678.4	negative
585	131.04	625.76	NA	25473	26320.6	43092	7859.6	39842.1	31839	47354.8	36569	15402.1	37250.3	33251	42298	37087.7	negative
586	288.12	706.86	22607.6	80695	86034	62826	16144	58591.1	48085	53331.5	43918	48782.6	11124.5	8530.6	18181	14738.1	negative
587	495.15	532.48	9149.38	104812	56132.1	1E+05	21680	1852.03	38476	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	negative
588	160.06	505.38	6144.38	22142	10723.9	27606	16579	25169	12768	32167.2	89624	48122.8	40114.3	102321	60434	39828.5	negative
589	178.05	301.19	2091.49	29577	56108.7	22863	46794	101284	48931	2120.62	68821	15010.1	1533.66	2607.6	4996	11857.1	negative
590	300.05	757.21	NA	22623	12369.5	17528	87105	68230.4	77493	29316.7	15531	17892.3	16407.8	16147	37088	28041.4	negative
591	383.11	704.49	8714.28	29769	24147	45518	21912	38288.2	30453	37308.1	32659	49784.8	21855.5	29765	24175	30208	negative
592	131.08	1091	2949.48	19318	7552.85	22841	4116.2	12620.7	21976	18426.3	14449	69089.8	21865.9	8088.7	19189	14524.5	negative
593	293.18	216.32	28537.2	49678	40071.8	35289	29914	47102.3	34464	44599	68832	37712.7	46710.7	21278	42964	33053.4	negative
594	161.05	846.06	20400.9	26719	22457.1	32525	39265	18141.4	12775	68040.5	14439	21232.5	31428.4	15058	45768	25462.8	negative
595	289.07	852.38	NA	52012	47595.7	NA	22391	36358.4	40000	56369.5	66427	22873.8	58695.7	36602	61371	55607	negative
596	171.04	793	4238.14	24498	13025.2	29905	7511.3	24644	12940	65848	59027	37219.9	32457.5	31243	59007	64118.6	negative
597	134.05	818.3	2463.38	36101	6399.71	14336	1688.3	15977.7	10019	22794.7	22280	10531.7	18665.2	17786	20348	15355.3	negative
598	289.14	691.88	NA	12182	4765.45	4857	1874.8	11831.7	9766.2	62696.8	59753	56312.2	58042.2	48003	52670	56965.2	negative
599	146.05	622.01	20794.9	36959	25342.4	35256	13323	62604.1	32567	59901.2	45319	49298.2	29852.9	35717	59271	52741.7	negative
600	218.09	594.18	1640.01	16247	8988.99	27308	10718	26384.5	16316	30543	62230	62365.3	36309.5	59712	41345	37255.4	negative
601	85.03	894.73	NA	25190	4031.32	NA	15007	29402	6109.6	3931.62	6427.9	5391.78	10148.1	1966.9	5044.4	6947.18	negative
602	136.03	621.93	NA	NA	38232.8	54216	21976	54210	48201	54594.8	56914	29793.7	54592.3	47863	59400	54522.4	negative
603	155.05	640.9	4381.52	6817.6	7137.3	7661	1312.8	7666.96	59469	6488.23	13858	57297.6	8480.99	11416	10004	5652.05	negative
604	307.08	671.77	NA	NA	4984.5	14584	2259.9	10357.1	6826.9	24532.1	18864	16588.5	30879.3	6399.2	23114	21439	negative
605	302.05	962.92	NA	11710	7877.22	NA	6672.2	28533.4	11743	10836.6	4776.5	5324.95	4183.39	2973.8	5449.8	5831.43	negative
606	153	669.96	4715.3	4637.9	4406.35	9318	3775.4	10894.1	5279.6	31771.4	27254	44896.2	54612	25579	28658	31167.9	negative
607	244.06	752.69	NA	15009	18607.7	NA	7233	20857.1	20593	50932.5	24438	40908.1	48944.6	41322	48372	23264.3	negative
608	134.05	422.93	1149.88	13804	20816.2	23915	3795.9	21905.5	17686	46894.2	36486	12561.4	20585.6	29125	40131	36905.6	negative
609	113.02	760.45	4334.17	12125	3617.88	6318	15465	15703	11054	45557.3	16298	2510.07	41307	2153	37941	49191.1	negative
610	126.03	790.83	838.33	17230	5379.47	17881	1555.9	12560.9	4693.2	48913.7	25503	38586.9	39203.5	20956	39845	25754.3	negative
611	206.95	985.42	41001	40776	41372.2	35276	48755	42881.3	44173	40776.2	42056	41784.6	43053.3	43146	41944	41690.2	negative
612	312.91	992.71	14668.8	12976	14935.8	11601	15578	13313.4	15502	11808.3	13216	14149.8	13175.2	14451	12269	13360.4	negative
613	356.9	983.25	8325.96	10950	10554	7651	11924	11125.1	10858	10932.9	11665	10651.8	10828.5	12242	11273	10112.8	negative
614	161.05	754.65	10921	17554	14120.8	31566	12877	22278.5	14172	40131.7	25486	20968.3	47576.9	16630	32214	38501.9	negative
615	190.07	543.47	2268.68	3654.2	4925.67	7245	4535.6	6722.1	5459.2	11160.3	27608	47550.6	10298	37889	15578	13094.5	negative
616	413.2	226.01	5058.72	6455.7	7637.76	8890	14035	2866.43	10869	3858.02	11831	12845.6	11591.3	25624	45484	33203.7	negative
617	119.03	615.7	1306	4169	4265.88	2508	1363.1	8320.62	5681.6	5777.45	11314	44624.9	2429.29	3923.3	4271.4	4514.52	negative
618	116.91	328.11	7713.56	21440	32142.8	16877	43625	24109.2	24030	22518.2	25942	24477.7	17922.7	25473	26063	22077.3	negative
619	118.9	325.02	7548.07	21089	31556.3	16168	42967	24204.5	23277	21916.9	26302	24155.7	18411	26987	28239	22054.3	negative
620	120.9	334.44	2394.97	6833.4	11072	5274	8824.9	8035.11	7659.9	7260.26	8672.7	7909.22	5981.42	8915	8656.7	7880.74	negative
621	277.03	872.19	1988.72	40805	7304.44	39342	3941.7	10291.4	8465.5	17873.2	28827	8357.67	29672.5	14055	10476	31202.3	negative
622	189.04	639.35	31213.6	24408	18535.3	28741	16824	37397	23709	4729.22	22540	33665.2	13625.6	13098	8181.3	14760.5	negative
623	87.009	878.12	NA	18553	7068.71	NA	11087	27489	9091	13881.4	12166	12114.9	9070.95	10255	10479	14273.4	negative
624	255.09	485.77	NA	1974.6	1792.57	3227	3691.9	5617.5	3283.6	25603.1	24165	36950.3	10235	22967	21093	20207.7	negative
625	101.06	333.41	6519.68	13337	6732.42	11288	13545	21348.6	12133	20988.9	15120	34573.2	18585.6	29042	28084	29274.2	negative
626	131.04	743.72	3488.														

peak id	Mass	RT	1.mzXML	2.mzXML	3.mzXML	4.mzXML	5.mzXML	6.mzXML	7.mzXML	14.mzXML	15.mzXML	16.mzXML	18.mzXML	19.mzXML	20.mzXML	21.mzXML	polarity
634	220.89	1123.3	7719.63	22095	21267.2	22974	22768	23591.3	23460	21879.3	23869	14746.1	19938	23366	21667	22631.7	negative
635	328.06	750.4	7925.68	23674	10604.7	17641	7452.9	15414.9	16977	15996.9	15936	4748.35	13578.1	15002	10396	14193.5	negative
636	125.01	809.9	10104.9	23639	16267.2	NA	7251.4	22232	14047	15343.8	18518	16372	10866.7	13316	12973	13003.4	negative
637	110.98	530.38	2194.81	5049	6537.07	3009	1795.8	7701.98	4840.6	10420.2	2460	2413.67	2187.09	2927.5	4877.3	3796.53	negative
638	187.13	228.11	1407.18	NA	2788.9	3313	8164.3	5597.62	NA	9016.9	11839	8164.08	3495.72	22705	4757.6	14494.7	negative
639	368.04	716.88	7440.81	19618	4147.02	2021	NA	3391.49	1881.6	2921.61	2609.7	NA	8429.76	5397.7	1399.2	NA	negative
640	192.03	454.81	547.34	1075.5	754.11	2763	4046.4	7753.51	3247.4	13030.9	20512	21279.5	4843.63	13001	13440	11336.6	negative
641	155.07	761.66	7925.27	3367.2	21124.9	NA	5714.4	3941.89	2862.9	7958.49	7935.7	13355.8	7312.17	5103	6431.1	4726.07	negative
642	485.2	1044.3	NA	16279	10430.8	20027	4583.2	13736.3	15669	11096.3	9681.4	10691.8	8471.78	8250.8	8881.8	10754.1	negative
643	157.01	589.63	7915.84	16035	10886.6	16410	16554	15259.1	19649	16271.7	17787	13656.3	15382.2	16879	17580	15802.5	negative
644	330.07	621.32	8286.94	12305	13821.4	19178	7633.4	15829	17050	12305.5	13680	6775.06	16171.2	17845	12884	13447.1	negative
645	207.01	857.41	NA	13903	1366.89	NA	525.79	7237.55	2941.6	9168.4	19126	4644.44	15501.1	11374	13011	14019.1	negative
646	130.05	534.58	4878.79	3060.7	4232.26	5741	5392	7169.47	5281	9569.1	8435.6	12589.6	5611.63	6500.2	18709	13066.6	negative
647	149.06	271.05	5609.8	6477	3287.1	7750	4718.4	15259.1	10670	10089.9	10923	14340.8	6433.18	12614	18180	15847	negative
648	202.09	234.31	2800.01	1883.4	1085.63	4426	8616.3	8892.21	8680.2	9068.93	7632.4	14013.6	3853.31	7681.4	14712	9135.66	negative
649	212	479.2	1277.07	5666.9	2328.39	5633	6197.5	12778.3	7021.7	15710.1	5035	14851.9	2466.73	2179.9	1436.4	5034.03	negative
650	271	805.25	15621.1	11662	11611.9	10475	10135	12466.7	10921	9581.39	11039	10951.9	5637.36	10179	7080.4	8072.82	negative
651	128.04	421.7	717.74	2670.1	6147.24	1055	6614.2	6541.51	5280.4	7097.9	4789.5	5023.91	5712.64	5068.5	5647	7933.52	negative
652	201.12	675.88	NA	5559.4	3099.67	2398	850.48	7992.14	5336.6	4620.35	3761.6	7964.59	2090.85	2117.9	6580.9	5256.49	negative
653	215.17	220.04	1121.72	1871.8	2020.96	1971	4148	5714.21	3743.1	10643.5	8053.1	9136.4	2156.8	13624	3901.8	8379.91	negative
654	203.02	784.2	2664.14	9170.2	8443.3	10005	8239.4	7573.9	12222	13450.5	10807	12153	9204.75	7221.5	10250	11003.6	negative
655	258.04	793.97	909.43	2038.2	1376.56	5667	1225.8	3073.42	2915.5	9403.36	11775	6329.65	8340.55	7130.2	13360	8446.41	negative
656	137.04	542.47	1926.1	2221.6	1143.66	2427	1787.9	4935.69	2671.1	3771.79	4889.1	3260.57	1565.31	3939	6686.1	2310.55	negative
657	152.99	868.35	1695.48	11102	4564.09	6454	2138	9461.1	6966.4	9471.74	6293.7	2833.42	9547.79	4721.8	7693.7	5648.23	negative
658	174.95	831.4	6030.42	6542.9	7387.66	11931	6915.3	7933.34	8483.9	6775.02	8989.4	9483.4	12190.8	8976	7496.6	8364.35	negative
659	118.94	911.13	2298.28	7213.1	3104.28	4173	4043.8	12144.2	5604.5	9897.06	7255.9	6703.96	5121.44	4957.4	2802.3	3234.63	negative
660	182.93	1086.9	11507.9	11379	9257.25	9798	10777	10719.5	9484.3	11227.1	10000	8318.49	9658.26	10468	10468	9142.72	negative
661	101.02	866.16	NA	5858	1997.25	NA	2086.5	11943.7	5836	11758.3	8182	7464.02	4804.22	6948.1	7815.3	11477.7	negative
662	113.04	440.38	NA	3347.9	1270.36	NA	5632.8	11915.1	8264.1	4475.55	5558.6	8536.23	2576.68	7317.6	3059.7	6602.6	negative
663	138.94	1123.1	10398.2	10117	9813.24	10618	10443	10091.6	10646	9823.81	10786	9492.4	10728.4	10257	10144	10841.9	negative
664	113.05	776.23	NA	4324.6	1751.84	2435	410.6	2426.72	1423.3	11421.4	5428.2	6754.83	9858.42	4993.7	9436.3	6308.42	negative
665	167.04	787.38	1777.91	3136.8	4330.07	2483	3174.9	3213.67	5088.7	4013.2	5744.2	5076.89	8100.15	10964	5891.2	7292.78	negative
666	204.07	478.32	370.85	3017.2	2361.97	3240	2171.2	9126.01	4173.7	3653.42	7217.9	10882.1	3018.66	7617.3	4361.8	8401.69	negative
667	164.06	673.17	NA	4931	2524.34	3857	1458.7	2263.03	2139	782.63	10478	10486.4	7101.08	4900.8	7029.1	8380.86	negative
668	172.14	223.39	679.35	2142.9	2075.07	2211	4425.7	5125.01	7887.1	3735.52	9129.2	6933.29	3091.34	8138.2	4382.2	9696.52	negative
669	325.18	1426.7	7999.68	8635.8	9352.99	8544	8721.5	7799.98	8867.7	9549.52	8543.9	8324.42	9380.59	7706.1	8644.8	9269.03	negative
670	263.07	476.21	NA	182.39	NA	NA	NA	523.98	NA	5979.07	6841	9610.19	3002.05	8267.1	7386.1	5973.35	negative
671	262.06	678.8	NA	5617.6	1349.67	NA	1108.9	1288.95	1647.9	7788.79	4914.5	2513.82	9273.89	1747.3	6705.2	7245.8	negative
672	201.14	1055.6	438.59	3921.1	2477.46	3384	893.74	5937.35	3407	5517.77	3936.2	9169.02	2347.35	2793.8	4331.7	3217.63	negative
673	588.08	869.93	3285.89	9203.8	3301.47	6321	910.12	6994.89	5312	6024.82	6539.5	1038.73	6332.25	3608.1	4900.6	5760.68	negative
674	237.12	418.91	4677.25	4681.9	9015.07	5042	9123.6	5749.58	6573.4	6817.48	7274.6	6214.62	5922.6	7389	7430.3	7023.7	negative
675	90.028	821.51	1661.05	6674.8	2957.17	8422	3882.9	7825.11	4414.9	9114.14	6942.2	6071.44	5365.97	5013	6787.3	5609.89	negative
676	429.13	713.64	1918.92	4425.6	6213.53	5423	7195.7	1621.3	3264.2	6451.41	1556.8	NA	3122.17	NA	8178.4	3989.06	negative
677	184.1	614.97	NA	2059.1	421.87	NA	2092	1403.8	1782.5	3595.08	4449	5123.08	3814.56	5411	3619.2	4438.61	negative
678	172.96	909.74	8336.62	3567.3	6902.94	4650	6977.6	4484.38	6425	3173.48	4647.3	4883.42	3672.19	4410.8	3321.1	4296.89	negative
679	94.993	1321.6	NA	7495.3	7681.98	3679	6984.6	7056.19	7168.4	6912.34	7435.7	6826.27	7180.28	7286.4	6852.7	7104.42	negative
680	245.03	872.88	6080.91	6122.3	7495.99	4753	6758.3	4296.24	5113	5174.68	4732.7	6238.11	3537.67	5724.6	3574.3	4675.77	negative
681	73.25	206.98	NA	NA	NA	NA	3551.1	831.33	721.51	2719.09	3368.2	7293.53	2079.21	7267.9	4455.7	3034.78	negative
682	185.06	611.02	302.11	710.63	508.07	1022	605.13	821.52	2159.3	3512.9	3916.5	3257.42	2771.42	1591.2	6315	5929.33	negative
683	243.97	814.72	4017.48	4883.5	4719.03	4394	5934.8	6863.8	6107.5	4044.96	6564	6588.47	4148.68	6593	3953.5	4530.13	negative
684	188.06	525.73	320.04	1782.3	2741.44	1530	513.43	4553.98	1970.7	3957.45	4046.2	4281.66	4098.06	3689	4330.1	5057.63	negative
685	288.13	876.75	793.14	4965.6	1981.9	4362	938.57	4366.33	3520.3	6629.33	4711.9	3002.92	3466.11	3367.7	1329	4796.1	negative
686	254.91	816.01	2740.85	4412.6	4339.48	3513	4238.4	4636.76	5971.7	3735.68	5887.8	5509.25	4841.07	6344.1	4590.5	5118.41	negative
687	98.025	422.69	677.29	1221.1	1932.77	1717	1577.8	1999.31	5134.9	2204.78	1505.4	1405.33	1470.35	1450.7	1233.4	1887.26	negative
688	201.05	806.15	NA	2290.9	1030.36	1566	908.81	1496.67	1307	4594.01	3277.8	2440.33	2351.37	2380.8	5200.7	4700.76	negative
689	327.06	699.17	5797.33	5011.5	3671.56	5452	2637.7	4967.62	3783.7	NA	1282.2	2016.77	2316.34	2282.6	573.67	1624.62	negative
690	171.07	634.5	1398.93	5044.9	3638.6	2038	3700	2932.66	3406.7	2490	3136.2	3535.62	2733.72	965.51	1412.9	1045.03	negative