

**Niveles circulantes de microRNAs asociados a daño miocárdico y severidad de falla
cardíaca en pacientes con enfermedad de Chagas**

Silvia Catalina Blanco Rueda

Trabajo de Grado para optar al Título de Bióloga

Tutor

Paula Katherine Bautista-Niño

PhD en investigación cardiovascular

Universidad Industrial de Santander

Facultad de Ciencias Básicas

Escuela de Biología

Bucaramanga

2022

Dedicatoria

Principalmente, quiero dedicar este trabajo de grado a mis padres Oscar Blanco y Lucila Rueda, quienes desde muy pequeña me han apoyado incondicionalmente para cumplir todos mis sueños. A la memoria de mi tío Carlos Rueda, quien fue y sigue siendo mi motivación y uno de mis mayores ídolos en la vida y quien espero que esté muy orgulloso de este logro. También a los demás miembros de mi familia y amigos que han estado conmigo a lo largo de este proceso.

Los amo Cholupitas <3

Agradecimientos

Comenzar por agradecer a mis padres quienes hicieron posible que yo pudiera estudiar una carrera universitaria y me apoyaron en cada paso. También a todas las personas que hicieron parte de mi proceso de formación personal (Familia Duncan, Club de natación Neptuno Santander y coral UIS) y académica que hoy me hacen una persona dedicada y capaz de afrontar cada desafío de la mejor manera para salir adelante. A la doctora Paula Bautista, tutora de este proyecto y directora del Laboratorio de investigaciones de la Fundación Cardiovascular, por haberme recibido e instruido en cada momento de este proyecto. A la doctora Norma Serrano por haberme tenido en cuenta y recomendarme para poder llevar a cabo mi proyecto de grado en la institución. A todo el equipo del laboratorio de investigación y genómica de la FCV por recibirme con los brazos abiertos y hacerme sentir a gusto durante mi estancia en la institución. Igualmente, a la escuela de biología y todos los docentes que hicieron parte de mi proceso de formación durante estos 6 años y a la Universidad Industrial de Santander, mi alma mater, por brindar siempre espacios que me permitieron crecer personal y académicamente para lograr obtener el título de Bióloga UIS.

Contenido

	Pág.
Introducción	9
1. Objetivos	13
1.1 Objetivo General	13
1.2 Objetivos Específicos.....	13
2. Metodología	14
2.1 Cuantificación de miRNAs en suero sanguíneo	14
2.2 Análisis de datos	16
3. Resultados	17
3.1 Características de la población.....	17
3.2 Niveles circulantes de NT-proBNP, miR-185, miR-34a y miR let-7d.....	17
3.3 Correlación entre biomarcadores	21
4. Discusión.....	22
5. Conclusión	27
Referencias Bibliográficas	29
Anexos	41

Lista de Figuras

	Pág.
Figura 1. Expresión de microRNAs en pacientes indeterminados y con cardiomiopatía.....	20
Figura 2. Expresión de microRNAs dentro de cada grupo de clasificación según la NYHA.	21
Figura 3. Valores de correlación entre biomarcadores evaluados.....	22

Lista de Tablas

	Pág.
Tabla 1. Resumen de las características clínicas y sociodemográficas de los pacientes participantes en el estudio.	18
Tabla 2. Resumen de niveles circulantes de de NT-proBNP, miR-34a, miR-185 y miR let-7d. .	19

Resumen

Título: Niveles circulantes de microRNAs asociados a daño miocárdico y severidad de falla cardíaca en pacientes con enfermedad de Chagas*

Autor: Silvia Clatalina Blanco Rueda**

Palabras Clave: MicroRNA, falla cardíaca, enfermedad de Chagas, NT-proBNP, NYHA.

Descripción

La enfermedad de Chagas es una enfermedad tropical que, a largo plazo, puede afectar la función cardiovascular de las personas que la padecen; provocando una miocardiopatía dilatada en respuesta al proceso inflamatorio que tiene lugar por la infección de *T. cruzi* sumado a otros factores. Los avances en biología molecular han permitido la identificación de diferentes biomarcadores como los microRNAs, que se encuentran asociados a diferentes patologías cardíacas; sin embargo, es poco lo que se conoce de su potencial dentro de la falla cardíaca de etiología chagásica. Este estudio analiza los niveles circulantes de 4 microRNAs (miR-34a, miR-185, miR 30d y let-7d) mediante qRT-PCR en 98 pacientes diagnosticados con la enfermedad de Chagas con el fin de evaluar su asociación con la falla cardíaca de origen chagásico. Los resultados de este estudio muestran que de los microRNAs evaluados los niveles de miR-185 y let-7d, cuyo rol es favorable para la recuperación cardíaca son mayores en comparación con miR-34a. No se encontraron diferencias estadísticamente significativas para ninguno de los microRNAs evaluados al comparar los niveles en pacientes en etapa indeterminada y aquellos con una cardiomiopatía desarrollada. Es evidente que existe una gran variabilidad en los resultados que podría deberse a múltiples factores, como la técnica utilizada, la cantidad de muestras y su distribución que podrían tenerse en cuenta en un futuro estudio para mejorar la precisión de los resultados.

* Trabajo de Grado

** Facultad de Ciencias Básicas. Escuela de Biología. Director: Paula Katherine Bautista-Niño, PhD en investigación cardiovascular

Abstract

Título: Circulating levels of microRNAs associated with myocardial damage and severity of heart failure in patients with Chagas disease*

Author: Silvia Clatalina Blanco Rueda**

Keywords: MicroRNA, heart failure, Chagas disease, NT-proBNP, NYHA.

Description

Chagas disease is a tropical disease that, in the long term, can affect the cardiovascular function of those who suffer from it, causing dilated cardiomyopathy in response to the inflammatory process that takes place due to *T. cruzi* infection in addition to other factors. Advances in molecular biology allowed the identification of different biomarkers such as microRNAs, which are associated with different cardiac pathologies; however, little is known about their potential in heart failure of chagasic etiology. This study analyzes the circulating levels of 4 microRNAs (miR-34a, miR-185, miR-30d and let-7d) by qRT-PCR in 98 patients diagnosed with Chagas disease in order to evaluate their association with heart failure of Chagasic patients. The results of this study shown that the levels of miR-185 and let-7d, whose role is favorable for cardiac recovery, are higher compared to miR-34a. Furthermore, no statistically significant differences were found for any of the microRNAs evaluated when comparing the levels in patients in the indeterminate stage and those with developed cardiomyopathy. It is evident that there is a large variability in the results that could be due to multiple factors, such as the technique used, the number of samples and their distribution that could be considered in a future study to improve the accuracy of the results.

* Degree project

** School of Biology. Head: Paula Katherine Bautista-Niño, PhD in cardiovascular research

Introducción

Las enfermedades cardiovasculares (ECV) siguen siendo un problema importante de salud pública en todo el mundo, con alta prevalencia en nuestra población, pobre pronóstico a largo plazo y grandes costos en la atención de salud (Rincon *et al.*, 2015). La enfermedad de Chagas o tripanosomiasis americana, causada por el protozoo *Trypanosoma cruzi*, es una de las principales causas de falla cardíaca en Sur América (Rassi *et al.*, 2010, Rosas Andrade *et al.*, 2007). Datos presentados por la Organización mundial de la salud (OMS) y la organización panamericana de salud (OPS) muestran que aproximadamente 65 millones de personas viven en condiciones de riesgo de contraer esta enfermedad en las Américas; también, indican que 6 millones son las personas que se ven realmente afectadas por la enfermedad (OPS & OMS., 2018). Dentro de los afectados, se estima que entre 70 y 90% desarrollan la típica miocardiopatía dilatada que caracteriza a la enfermedad y entre el 25 y 35% de ellos evolucionan hacia una arritmia aguda que puede causar la muerte o una insuficiencia cardíaca progresiva (Munoz Saravia *et al.*, 2013, OMS, Altclas *et al.*, 2010).

Actualmente, se considera un paciente seropositivo para Chagas a aquel que presente dos o más pruebas serológicas positivas; las técnicas más utilizadas en el diagnóstico de la enfermedad son la inmunofluorescencia indirecta (IFI), enzimoimmunoensayo (ELISA), hemoaglutinación indirecta (AHI) y la aglutinación de partículas (Giménez *et al.*, 2019). Por otro lado, las pruebas fisiopatológicas realizadas son principalmente electrocardiogramas, ecocardiogramas y radiografías de tórax (Giménez *et al.*, 2019, Gascón *et al.*, 2007). Dentro de este diagnóstico, una de las herramientas más útiles para identificar población de alto riesgo cardiovascular es la valoración de la fracción de eyección del ventrículo izquierdo (LVEF por sus siglas en inglés) (Al-

Khatib et al., 2018), esta determina el porcentaje de sangre que se bombea del corazón hacia el resto del organismo teniendo en cuenta la disminución del volumen del ventrículo izquierdo (Curtis et al., 2003, Kroman & Patton, 2020). Según la *American Heart Association* (AHA) una fracción de eyección ventricular normal se encuentra entre el 50 y 75%, mientras que una inferior al 40% corresponde a una insuficiencia cardíaca (IC) mayor. Cabe resaltar que ningún otro marcador de riesgo ha mostrado un mejor valor predictivo (Santangeli et al., 2011), es por esto que la clasificación según la AHA de pacientes con falla cardíaca chagásica se realiza basada en este factor (Rosas Andrade et al., 2007, Xavier et al., 2005).

Existen dos fases clínicas en las que se clasifica a los pacientes luego de la infección por *T. cruzi*: La fase aguda, correspondiente los primeros días o meses luego de ser infectado y donde el paciente puede presentar o no síntomas como dolores de cabeza, fiebre, dolor articular, entre otros, asociados a un resfriado común, causados por la infección recientemente adquirida; y la fase crónica, correspondiente al momento en el que el paciente presenta una infección avanzada y puede comenzar a presentar complicaciones digestivas y/o cardiovasculares (Acquatella et al., 2017; Bocchi, 2013). Por lo anterior, se ha determinado la clasificación de pacientes en etapa crónica de la enfermedad dentro de 4 estadios según la AHA, el estadio A representa la forma indeterminada, en la que el paciente presenta una serología positiva pero no existe daño cardíaco, el B en el que el sello distintivo es la presencia asintomática de una miocardiopatía estructural caracterizada por cambios electrocardiográficos o ecocardiográficos y finalmente los estadios C y D en los que se presenta una insuficiencia cardíaca refractaria o no (Acquatella et al., 2017). La *New York Heart Association* (NYHA) plantea otra forma de clasificar a los pacientes con dificultades cardíacas; al igual que la AHA, esta entidad clasifica a los pacientes de acuerdo a la funcionalidad cardiovascular desde la clase I a la IV, siendo la clase I aquellos pacientes sin

limitación en la actividad física y la IV quienes presentan incapacidad para llevar a cabo cualquier actividad (Rostagno et al., 2000).

Gracias a los avances en biología molecular, en las últimas décadas se ha podido identificar y estudiar el valor diagnóstico de algunos biomarcadores que se encuentran asociados a la falla cardíaca de diferentes etiologías (Zhang et al., 2018). A lo largo de los años, se ha encontrado que los péptidos natriuréticos de tipo B (BNP) son marcadores que están específicamente relacionados a funciones ventriculares y se han mostrado efectivos a la hora de la evaluación del riesgo de pacientes con falla cardíaca de diferentes etiologías (Munoz Saravia et al., 2013, Alejandro Salomone, 2002). Según se ha observado, este biomarcador está relacionado con la dilatación miocárdica ya que es secretado al torrente sanguíneo en respuesta al estiramiento de las cavidades ventriculares, lo que ha sugerido su uso para el diagnóstico de pacientes que padecen de falla cardíaca de origen chagásico en su forma N-Terminal (NT-proBNP) (Pozo et al., 2014, Mady et al., 2007, Ruskoaho, 2003, Talvani et al., 2004, Pereira-Barretto et al., 2013).

Los MicroRNAs (miRNAs), han sido recientemente considerados como un nuevo marcador biológico para el diagnóstico de diferentes enfermedades (Melman et al., 2014). Estas cadenas cortas (~22 nucleótidos) de ARN no codificante regulan la expresión post-transcripcional de aproximadamente el 60% de los genes codificantes para alguna proteína en los seres humanos (Peterlin et al., 2020; Vegter et al., 2016) y se estima que aproximadamente 100 de ellos están relacionados con problemas de salud (Chen et al., 2008). Los miRNAs circulantes han mostrado una mayor resistencia a la degradación por RNAsas, por lo que se les consideran marcadores biológicos óptimos para el diagnóstico de diferentes enfermedades dentro de las que se encuentran las ECV, dado que se han identificado más de 30 miRNAs asociados a esta patología (Zhou et al., 2018). Como ejemplo, algunos estudios realizados, como el de Ferreira et al (2014), encuentran

altos niveles de miR-133a-2, miR-133b, miR-208a y miR-208b en pacientes con cardiomiopatía chagásica en comparación con controles negativos. Por otro lado, Nonanka et al (2019) encontraron relación, ya sea positiva o negativa, entre los niveles de expresión de miR-19a-3p, miR-21-5p y miR-29b-3p y variables clínicas como la fibrosis cardíaca, la cardiopatía hipertófica y la fracción de eyección ventricular, mostrando que los niveles circulantes de estos microRNAs pueden ser considerados como biomarcadores para la detección de la cardiopatía chagásica. Asimismo, otros investigadores han identificado que microRNAs como miR-34a-5p, miR-185-5p, miR-223-5p, miR-208-5p y let-7d están significativamente asociados con la falla cardíaca de diferentes etiologías (Peterlin et al., 2020, Montgomery et al., 2011, Bernardo et al., 2014).

En Latinoamérica muy pocos estudios se han enfocado en relacionar la presencia de biomarcadores cardíacos como NT-proBPN con la severidad de la falla cardíaca provocada por *T. cruzi*, sin embargo, no existe claridad en el rol de otros biomarcadores como los miRNAs circulantes para valorar la severidad del daño causado por este parásito (Echeverría et al., 2017; Munoz Saravia et al., 2013; Okamoto et al., 2014, Peterlin et al., 2020). Según la OMS, sólo el 1% de los pacientes infectados por *T. cruzi* anualmente reciben un diagnóstico y tratamiento adecuado y oportuno para tratar esta enfermedad; por lo cual, se considera al estudio y la determinación de biomarcadores relacionados con el diagnóstico de la falla cardíaca de origen chagásico como una herramienta en la medicina de precisión que podría brindar ayuda en la detección temprana y asimismo, lograr una mejor evaluación del tratamiento a seguir en cada uno de los pacientes que presentan esta patología (Munoz Saravia et al., 2013 Peterlin et al., 2020). Es por esto, que el objetivo de este trabajo es evaluar la asociación de los niveles circulantes de NT-proBNP, miR-34a, miR-185, let-7d y miR-30d con la presencia de daño miocárdico y la severidad de falla cardiaca en pacientes con enfermedad de Chagas.

1. Objetivos

1.1 Objetivo General

Evaluar la asociación de los niveles circulantes de NT-proBNP, miR-34a, miR-185, let-7d y miR-30d con la presencia de daño miocárdico y la severidad de falla cardiaca en pacientes con enfermedad de Chagas.

1.2 Objetivos Específicos

Comparar las características clínicas y sociodemográficas entre los pacientes con enfermedad de Chagas en estadio indeterminado y los pacientes que padecen miocardiopatía chagásica.

Evaluar la asociación de los niveles de microRNAs con la presencia de daño miocárdico al comparar los niveles en pacientes con enfermedad de Chagas en estadio indeterminado y los pacientes que desarrollaron miocardiopatía chagásica.

Evaluar en los pacientes con miocardiopatía chagásica la asociación de los niveles de microRNAs con la severidad de la falla cardíaca según la clasificación de la NYHA.

Establecer la correlación entre los niveles de NT-proBNP con los niveles de los diferentes microRNAs.

2. Metodología

En este estudio fueron incluidas muestras de suero de 98 pacientes diagnosticados con enfermedad de Chagas que se encuentran almacenadas en el biobanco del laboratorio de investigación de la Fundación Cardiovascular de Colombia (FCV). Mediante estudios electro y ecocardiográficos, estos pacientes fueron anteriormente clasificados, según la AHA, en aquellos con una miocardiopatía desarrollada (severidad de la enfermedad de Chagas B, C o D) y aquellos con una forma indeterminada de la enfermedad (severidad de la enfermedad de Chagas A). Asimismo, los pacientes fueron también clasificados según la clasificación para falla cardiaca de la *New York Heart Association* (NYHA) (Clase 1, 2, 3 o 4 siendo 1 el estadio menos severo). Estas muestras de suero fueron anteriormente utilizadas para medir los niveles circulantes de NT-proBNP mediante electroquimioluminiscencia y en esta ocasión fueron utilizadas para evaluar los niveles circulantes de los microRNAs miR-34a-5p, miR-185-5p, let-7d-5p y miR-30d-5p.

2.1 Cuantificación de miRNAs en suero sanguíneo

Para la purificación de ARN, incluidos microRNAs, se utilizó el kit *miRNeasy Serum/Plasma Advanced Kit* (Qiagen, Hilden, Alemania) (Anexo 1), a partir de 250 µl de suero siguiendo las instrucciones del fabricante. Inicialmente, todas las muestras fueron diluidas en 20 µl de agua libre de RNasa/DNasa. Para la reacción de poliadenilación, necesaria para la identificación de cada microRNA al momento de la cuantificación, se empleó un volumen fijo de 14 µl de ARN y 10 µl de la reacción de poliadenilación para la síntesis de ADNc siguiendo los pasos descritos en el manual de instrucciones del *1st-Strand cDNA Synthesis Kit* (Agilent

Technologies, Santa Clara, EE. UU.) (Anexo 2). Las reacciones cuantitativas en cadena de la polimerasa en tiempo real (qRT-PCR) la cuantificación de microRNA se realizó utilizando la miRNA QPCR Máster Mix (Agilent Technologies, Santa Clara, EE. UU.) en un termociclador en tiempo real CFX 96 C1000 (Bio-Rad, Hercules, CA, EE. UU.). Los cebadores utilizados para realizar las qRT-PCR fueron el cebador inverso (*reverse primer*) universal, incluido en el Kit de síntesis de ADNc (1st-Strand cDNA Synthesis Kit) y cebadores directos (*forward primers*) únicos y específicos para cada uno de los miRNAs en estudio, estos fueron diseñados para ser complementarios al extremo 3' de la hebra de ADNc siendo completamente idénticos en secuencia y longitud al propio miRNA y se obtuvieron de la casa comercial MacroGen en Corea (Anexo 3). Los ensayos individuales de qRT-PCR se realizaron por duplicado con un volumen de reacción total de 12 μ L (9 μ L Máster mix + 3 μ L ADNc). El ciclaje se configuró de la siguiente manera: 1. 95 °C durante 10 minutos, 2. 95 °C durante 10 segundos, 3. 60°C durante 15 segundos, 4. 72°C durante 20 segundos. Los pasos 2-4 se repitieron 44 veces.

Se llevó a cabo la cuantificación absoluta de los miRNAs, que implica la amplificación de oligonucleótidos a concentraciones conocidas para crear una curva estándar basada en los valores de Ct. Para cada uno de los miRNAs en estudio, se generaron curvas estándar de cinco puntos a partir de oligonucleótidos de ADN correspondientes a los miRNAs maduros. Como molde para transcripción inversa de los miRNAs se utilizaron diluciones seriadas (desde 10^4 - 10^8 copias / reacción) en agua libre de nucleasas/RNAsas de los oligonucleótidos. Todos los estándares y muestras desconocidas fueron tratadas de la misma manera. La cuantificación se realizó en el termociclador en tiempo real CFX 96 C1000 (Bio-Rad, Hercules, CA, EE. UU.) como se describió anteriormente y los porcentajes de eficiencia de las qPCRs se presentan en el anexo 4. Los valores

Ct de las muestras desconocidas se extrapolaron a la curva estándar para obtener el número de Copias (Anexo 5).

2.2 Análisis de datos

Se realizó un análisis de los datos recolectados en la encuesta diseñada para hacer la selección de pacientes en fase aguda y crónica de la enfermedad. Debido a que esta encuesta presentaba diferentes tipos de variables, cada tipo de variable fue analizada por separado siendo reportados los resultados como promedio, mediana o porcentaje de acuerdo con las características de los datos. La normalidad de estos se determinó mediante una prueba de Kolmogorov Smirnov, la existencia de diferencias significativas entre grupos se analizó mediante una prueba chi cuadrado en el caso de variables categóricas, una prueba t en caso de las variables continuas con distribución normal y una prueba Mann-Whitney cuando su distribución no seguía los parámetros de normalidad. Adicionalmente, con el fin de identificar qué tan relacionados se encuentran los niveles de estos miRNAs a medida que se avanza en la progresión de la enfermedad, se llevó a cabo un análisis descriptivo de la asociación de los niveles de los miRNAs dentro de las etapas de la falla cardíaca según la NYHA. Finalmente, para identificar el tipo de relación existente entre los niveles de NT-proBNP y los diferentes microRNAs, se realizó una correlación de Spearman. Todos los análisis fueron realizados utilizando el software R Studio v 1.4 y se consideraron diferencias significativas aquellas asociadas a un valor de $p < 0,05$.

3. Resultados

3.1 Características de la población

El total de muestras analizadas corresponde a 98 pacientes dentro del estudio, 26 de ellos pertenecientes a pacientes en etapa indeterminada de la enfermedad (IND) y 72 a pacientes que presentan cardiomiopatía chagásica (CMC). No se encuentran diferencias significativas entre la distribución de sexos entre los dos grupos; sin embargo, los pacientes en etapa indeterminada son más jóvenes que los pacientes en el grupo que presenta problemas cardíacos. Adicionalmente, se puede observar que más de la mitad de los pacientes viven en el área urbana (60%) pero pertenecen a un estrato bajo (98%) y que los medicamentos más utilizados son los betabloqueadores, antagonistas de la angiotensina y la aldosterona (Tabla 1).

3.2 Niveles circulantes de NT-proBNP, miR-185, miR-34a y miR let-7d

A partir de los resultados obtenidos de la medición de los niveles circulantes de miR-185, miR-34a y miR let-7d se construyó una base de datos con los resultados de expresión para cada uno de los 98 pacientes en el estudio junto con los datos para NT-proBNP, estos valores fueron transformados y reportados como el logaritmo natural del número de copias. A partir de una prueba de KW se determinó la existencia de diferencias significativas entre pacientes indeterminados y con daño cardíaco únicamente para el marcador NT-proBNP ($p < 0,05$) (Tabla 2).

Tabla 1.

Resumen de las características clínicas y sociodemográficas de los pacientes participantes en el estudio.

	IND (N=26)	CMC (N=72)	Total (N=98)	p valor
Edad (Años)	52 (24-69)	64 (33-80)	59 (24-80)	3,03E-07 ^C
Hombres	14 (53,8%)	43 (59,72%)	57 (58,1%)	0,77 ^A
Escolaridad				
Ninguno	4 (15,3%)	16 (22,2%)	20 (20,4%)	0,64 ^A
Básica	19 (73,1%)	56 (77,7%)	75 (76,5%)	0,83 ^A
Superior	3 (11,5%)	-	3 (3,1%)	0,24 ^A
Estrato				
bajo	26 (100%)	71 (98,61%)	97 (98,9%)	0,78 ^A
medio	-	1 (1,39%)	1 (1,0%)	
Alto	-	-	-	
Área residencia				
Urbano	11 (42,31%)	49 (68,06%)	60 (61,2%)	0,38 ^A
Rural	15 (57,69%)	23 (31,94%)	38 (38,8%)	0,38 ^A
Seguridad Social				
Contribuyente	9 (34,62%)	25 (34,72%)	34 (34,7%)	0,64 ^A
Subsidiado	17 (65,38%)	44 (61,1%)	61 (62,2%)	0,88 ^A
Otro	-	3 (4,17%)	3 (3,1%)	0,69 ^A
AHA				
A	25 (96,15%)	-	25 (25%)	5,40E-16 ^A
B	1 (3,85%)	1 (1,39%)	2 (2,0%)	
C	-	64 (88,89%)	64 (65,3%)	
D	-	7 (9,72%)	7 (7,1%)	
NYHA				
1	26 (100%)	28 (38,9%)	54 (55,1%)	5,47E-07 ^A
2	-	29 (40,28%)	29 (29,6%)	
3	-	15 (20,83%)	15 (15,3%)	
4	-	-	-	
Peso (kg)	64,05 (10,09)	62,41 (12,34)	62,8 (11,7)	0,54 ^B
Talla (m)	1,585 (0,09)	1,597 (0,09)	1,594 (0,09)	0,57 ^A
IMC (kg/m²)	25,609 (17,8-33,3)	23,518(18,2-40,6)	24,227 (17,8-40,6)	0,26 ^C

	IND (N=26)	CMC (N=72)	Total (N=98)	p valor
Medicamentos				
bbloq	-	69 (95,83%)	69 (70,4%)	2,20E-16 ^A
ieca_ara	-	63 (87,5%)	63 (64,3%)	9,75E-15 ^A
antald	-	59 (81,94%)	59 (60,2%)	1,40E-12 ^A
diuretico	-	45 (62,5%)	45 (45,9%)	1,50E-07 ^A
antcoag	-	38 (52,78%)	38 (38,8%)	6,81E-06 ^A

Nota. IND= Pacientes en etapa indeterminada, CMC= Pacientes que presentan cardiomiopatía chagásica. bbloq= Betabloqueadores, ieca_ara= Antagonistas de la angiotensina, antald= Antagonistas de la aldosterona, diuretico= -Diuréticos, antcoag= Anticoagulantes. A= prueba chi, B= una prueba t, C= Mann-Whitney.

La comparación entre los niveles de los diferentes microRNAs muestra que no existen diferencias significativas entre los niveles circulantes de miR-185 entre pacientes indeterminados y con cardiomiopatía chagásica (Figura 1.A), al igual que *miR-43a*; sin embargo, su expresión tiende a ser mayor en pacientes con implicaciones cardíacas (Figura 1.B), al igual que para el microRNA *let-7d* en donde se observa la mayor variabilidad en la expresión de este biomarcador para el grupo de pacientes en etapa indeterminada (Figura 1.C).

Tabla 2.

Resumen de niveles circulantes de de NT-proBNP, miR-34a, miR-185 y miR let-7d.

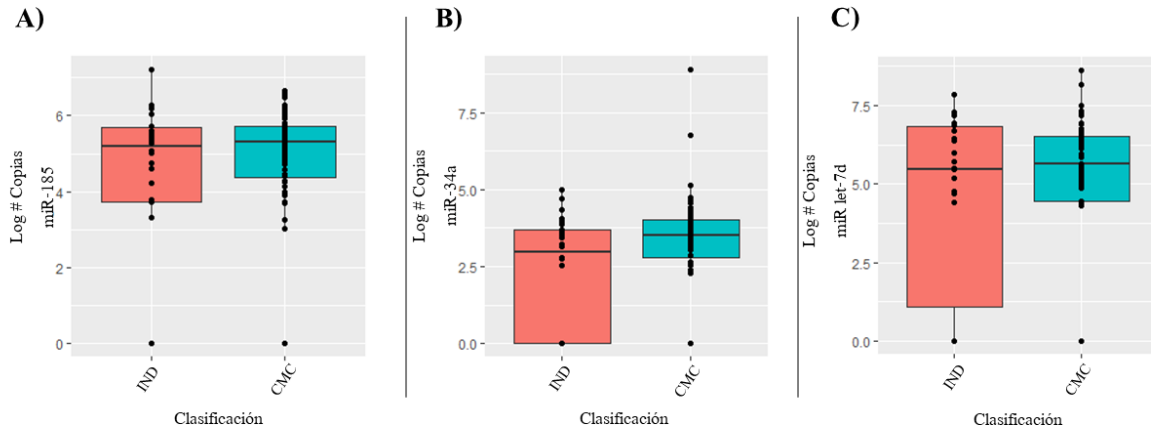
	IND (n=26)	CMC (n=72)	Total (N=98)	p valor
<i>NT-proBNP</i> (ng/ml)	3,49 [2,16-4,54]	7,57 [1,0-9,33]	7,03 [1,0-9,3]	2,21E-11
<i>miR let-7d</i>	5,48 [0-7,82]	6,13 [0-8,61]	5,59 [0-8,61]	0,65
<i>miR-34a</i>	2,97 [0-4,99]	3,68 [0-8,89]	3,47 [0-8,8]	0,05
<i>miR-185</i>	5,18 [0-7,21]	5,29 [0-6,65]	5,28 [0-7,21]	0,45

Nota. IND= pacientes en etapa indeterminada, CMC pacientes con cardiomiopatía chagásica.

Todas las unidades de los microRNAs están expresadas como el logaritmo del número de copias.

Figura 1.

Expresión de microRNAs en pacientes indeterminados y con cardiomiopatía.



Nota. A) miR-185 B) miR-34a C) miR Let-7d, IND= pacientes en etapa indeterminada, CMC= pacientes con cardiomiopatía chagásica.

Con el objetivo de evaluar que tan relacionados están estos microRNAs con la progresión de la falla cardíaca chagásica se realizó un gráfico de barras donde se asocian los niveles de cada microRNA a la categoría de falla cardíaca según la NYHA (Figura 2) donde se observa que no hay una diferencia marcada en cuanto a los niveles de los tres microRNAs a medida que la afección cardíaca aumenta, sin embargo, es evidente que el biomarcador que muestra los niveles más bajos en todas las etapas es el miR-34a, mientras que el de niveles más altos es let-7d, Igualmente se observa la existencia de una amplia variabilidad en los niveles de todos los microRNAs.

Dentro del estudio se contempló la medición de niveles circulantes de miR-30d, sin embargo, no fue posible mostrar sus resultados debido a que su curva estándar no arrojó resultados

de amplificación. A pesar de que llevaron a cabo múltiples experimentos para descartar las causas de la falla, ninguno de ellos obtuvo resultados favorables.

3.3 Correlación entre biomarcadores

Para determinar la relación entre los diferentes microRNAs y el péptido natriurético de tipo B se llevó a cabo una correlación múltiple, esta mostró que a pesar de que existe una correlación positiva entre NT-proBNP, miR-185 y miR-34a esta no es muy fuerte ($R=0,1$). Por otro lado, es notable la correlación existente entre los niveles de miR-185 y mir let-7d ($R=0,5$) (Figura 3).

Figura 2.

Expresión de microRNAs dentro de cada grupo de clasificación según la NYHA.

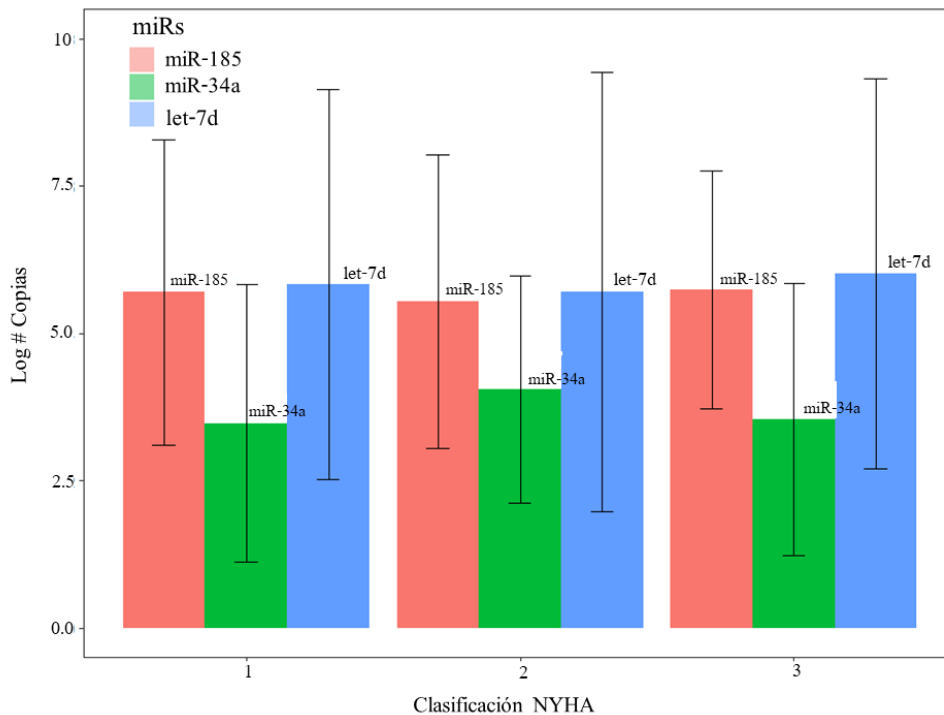
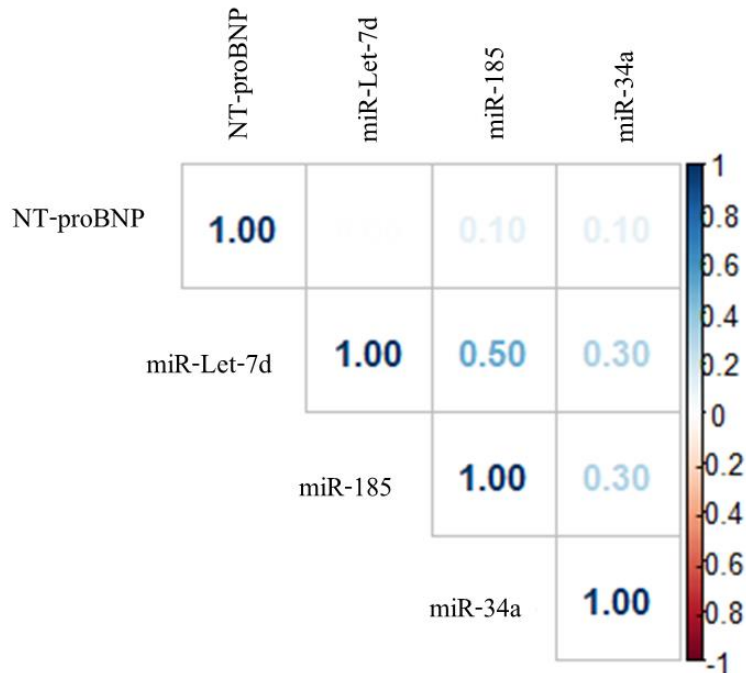


Figura 3.

Valores de correlación entre biomarcadores evaluados.

**4. Discusión**

A pesar de los recientes avances en el estudio de los microRNAs como nuevos biomarcadores y dianas terapéuticas en el ámbito del infarto agudo de miocardio y la insuficiencia cardíaca, los avances han sido menores en el ámbito de la enfermedad de Chagas y la miocardiopatía chagásica crónica. En el presente estudio se evaluaron los niveles circulantes de tres microRNAs (miR-34a, miR-185, let-7d), que han sido reportados como significativamente asociados con el diagnóstico y pronóstico de falla cardíaca y su asociación con la presencia de daño miocárdico.

En los pacientes que padecen enfermedad de Chagas, el daño cardíaco está mediado por el proceso inflamatorio producto de la respuesta inmune en el organismo, donde factores tróficos inflamatorios liberados por células del sistema inmune juegan un papel fundamental en el desarrollo de la cardiopatía (Angelo-Mendoza et al., 2005, Laugier et al., 2020). Se conoce que miR-185 regula genes asociados con la activación de células B secretoras de citoquinas como el factor de necrosis tumoral α (TNF α), el cual promueve el proceso inflamatorio al exceder su producción local (Lona et al., 2013). Yu et al (2016) reportan que, a comparación de pacientes sanos, los niveles de este microRNA son mayores en pacientes que padecen de cardiomiopatía dilatada y concluyen que entre más altos sean los niveles de este, el pronóstico de los pacientes mejora a largo plazo ya que se observó una mejoría en las dimensiones del ventrículo izquierdo y en la fracción de eyección ventricular. Asimismo, es conocido que el papel de miR-185 dentro del proceso inflamatorio está asociado a la regulación de genes que controlan los niveles de colágeno, evitando su acumulación en el tejido cardíaco y disminuyendo así este proceso y ayudando a la recuperación cardíaca (Lin et al., 2022). Este estudio encuentra niveles elevados de miR-185, concordando con los estudios anteriormente mencionados se podría suponer que los niveles de este se encuentran asociados al proceso inflamatorio causado por la infección por *T. cruzi* en el organismo. Si bien, en este caso no se observan diferencias significativas en los niveles de este microRNA entre los pacientes en etapa indeterminada y aquellos con cardiomiopatía, como se observa, por ejemplo, en el estudio realizado por Yu et al (2016) anteriormente mencionado, se debe tener en cuenta que a pesar de que los pacientes indeterminados no presentan problemas cardíacos, estos tienen un diagnóstico seropositivo para Chagas, donde una respuesta inmune contra el agente patógeno ha comenzado, lo que podría influir en la expresión de miR-185. A pesar

de ello, se puede observar una leve tendencia hacia el aumento de sus niveles dentro de pacientes del grupo que presenta implicaciones cardíacas (figura 1).

Por otro lado, la familia de microRNAs lethal 7 (let-7) se ha encontrado principalmente involucrada en procesos de supresión tumoral (Bao et al., 2013). Kolenda et al (2014) realizaron una revisión donde plantean el importante rol de let-7d en la regulación del ciclo celular, pues este microRNA participa en la regulación de genes y proteínas involucradas en la proliferación celular como CDK6, Dicer, KRAS y la ciclina D1. Ellos afirman que los bajos niveles de let-7 promueven el desarrollo descontrolado de células y se ha planteado como un marcador confiable dentro del cáncer de próstata y ovario. En un estudio para determinar el papel de let-7d-3p en el cáncer de ovario, García-Vázquez et al (2018) notaron una reducción en la proliferación celular del 80% en células SKOV-3 tratadas con un inhibidor de let-7d-3p en comparación con las no tratadas, sugiriendo que éste puede ser un marcador elemental en el planteamiento del tratamiento del paciente.

Igualmente, let-7 es una familia de genes muy conservada entre las especies, comparten una secuencia base y tienen diferentes dianas dentro de las cuales están genes involucrados en enfermedades cardiovasculares como la isquemia y el infarto agudo al miocardio (Wong et al., 2019). Aunque su rol preciso aún no está establecido, un estudio realizado por Bao et al (2013) encontró que pacientes con bajos niveles de let-7i mostraban pobres resultados clínicos a largo plazo. Al igual que miR-185-5p, let-7d-5p también atenúa el depósito de colágeno en el tejido miocárdico, impide la fibrosis y mejora la función cardíaca ya que su expresión hace posible la activación del receptor del factor activador de plaquetas (PTAFR) (Wong et al., 2019). Los datos analizados actualmente muestran que este microRNA es quien reporta los niveles más altos de los 3 microRNAs en estudio, comportamiento similar al de miR-185, sugiriendo que su correlación

($R=0.5$) puede deberse al efecto positivo que ambos tienen a nivel celular dentro del desarrollo de enfermedades cardiovasculares.

Contrario a let-7d y miR-185, miR-34a es un microRNA involucrado en la supresión del ciclo celular, la diferenciación celular y el desarrollo de órganos (Yang et al., 2015). Según Raucci et al (2021), algunas dianas de este microRNA son la ciclina D1, CDK4, CDK6, Bcl2, Sirt 1 y P53, aunque no haya un consenso claro para este último. En enfermedades cardiovasculares, miR-34a es conocido como un regulador esencial, al inhibir genes asociados a la recuperación celular, ya que este microRNA permite que exista una disminución en la fracción de eyección ventricular (Hua et al., 2022). Otra de las observaciones que se han realizado en el estudio de este microRNA es que sus niveles tienden a aumentar con la edad, Yang et al (2015) utilizaron ratones de diferentes edades a los que indujeron un infarto al miocardio y notaron que la pérdida de miR-34a mejora la función cardíaca, puesto que ratones jóvenes presentaban una mejor recuperación, y reduce la muerte celular en corazones con el tiempo, incluso en neonatos.

Este estudio reporta los niveles de miR-34a como los más bajos de los 3 biomarcadores analizados, a pesar de que hay un aumento en los niveles de miR-34a en los pacientes en etapa 2 de la clasificación según la NYHA, vemos como este vuelve a reducirse en los pacientes en etapa 3 (fig. 2) posiblemente por el tratamiento farmacológico e igualmente se encuentre asociado a la recuperación cardíaca. Además, al tener en cuenta el papel que juegan cada uno de los microRNAs estudiados dentro del desarrollo de la enfermedad, es posible que los bajos niveles de este microRNA estén asociados a los altos niveles de miR-185 y let-7d debido a sus implicaciones positivas hacia la regeneración celular explicando así la baja correlación encontrada (Fig 3).

Finalmente, la porción N terminal del péptido natriurético tipo B o NT-proBNP es una hormona secretada al torrente sanguíneo en respuesta al estiramiento del miocardio (Cao et al.,

2019), este biomarcador es calificado como estándar de oro para determinar el diagnóstico de la falla cardíaca (Gaggin et al., 2013). Además del estiramiento del miocardio, Talvani et al (2004), Maisel et al (2002), Hunt et al (1997), Maisel et al (2008), Januzzi et al (2019) y Rojas et al (2022) encontraron una marcada correlación positiva entre NT-proBNP y características clínicas relacionadas al funcionamiento cardiovascular como la disminución de la fracción de eyección del ventrículo izquierdo y el aumento en el diámetro de este; sin embargo, no se analizaron otro tipo de marcadores. Igualmente, Amorim et al (2017), realizaron un estudio donde muestra una correlación positiva entre NT-proBNP y biomarcadores como la proteína C reactiva, producida en el hígado como respuesta a procesos inflamatorios, y CA-125, un marcador tumoral que no es específico y que puede estar relacionado a otras enfermedades. Teniendo en cuenta lo anteriormente mencionado y las características mencionadas sobre los microRNAs, se podría esperar que en este estudio existiera una mayor correlación entre miR-34a y NT-proBNP relacionada a la progresión de la enfermedad, sin embargo, estos resultados pueden estar influidos por el tratamiento farmacológico o el tiempo que cada paciente lleve desde haber adquirido la enfermedad puesto que los síntomas pueden presentarse en tiempos diferentes y de múltiples formas en cada uno.

Al ser la clasificación según la NYHA un parámetro utilizado para determinar la severidad de la enfermedad, se esperaría ver una relación clara, sea positiva o negativa, entre esta clasificación y los diferentes microRNAs analizados como la que existe entre NT-proBNP y la misma, en donde todos los estudios muestran una tendencia de este biomarcador a aumentar a medida que progresa la enfermedad. Sin embargo, hay que tener en cuenta la heterogeneidad de los datos, ya que más de la mitad de los pacientes están clasificados en etapa 1 según la NYHA (55,1%) y esto podría influir en los resultados y ser la causa de la alta variabilidad observada.

Igualmente, hay que resaltar que existe una gran diferencia ente la cantidad de pacientes en etapa indeterminada y aquellos con cardiomiopatía chagásica, también se debe tener en cuenta que los análisis se realizaron con muestras de suero congeladas y que existen pruebas mejores y más específicas como la secuenciación de RNA que podría ayudar a la precisión de los resultados.

5. Conclusión

Los resultados muestran niveles elevados de miR-185, los cuales pueden deberse al proceso inflamatorio causado por la infección de *T. cruzi*. Al igual que miR-185, let-7d también presenta altos niveles que podrían asociarse a resultados positivos a largo plazo en cuanto a la recuperación cardíaca y la moderada correlación encontrada entre ellos podría deberse a las implicaciones positivas que ambos microRNA tienen dentro del campo. A pesar de que la clasificación según la NYHA es un parámetro que muestra una asociación marcada entre los niveles circulantes de NT-proBNP a medida que se da la progresión de la enfermedad, no es evidente la asociación entre esta clasificación y los niveles circulantes de los microRNAs evaluados, así como tampoco se encontró asociación entre los niveles de los diferentes microRNAs con la presencia de daño miocárdico y la severidad de la falla cardíaca. Adicionalmente, dentro del análisis realizado para comparar los niveles entre pacientes indeterminados y aquellos con implicaciones cardíacas, si bien se observa una tendencia a aumentar sus niveles en el grupo de pacientes cardíacos, esta no es clara y se sugiere la realización de un estudio con un mayor número de pacientes y una distribución más equitativa de los mismos para aumentar la precisión de los resultados.

Otro factor importante para tener en cuenta y que pudo influir en el resultado del estudio está relacionado con el almacenamiento de las muestras por un largo periodo de tiempo. Para futuros estudios, se sugiere un mejor control de variables preanalíticas como el periodo de congelación de las muestras, el tener en cuenta otras características clínicas relacionadas al funcionamiento cardíaco, como los resultados electro y ecocardiográficos, la fracción de eyección y las dimensiones del ventrículo izquierdo, así como la inclusión de otros microRNAs y sus cascadas de expresión. A pesar de ello, esta investigación aporta un acercamiento para lograr obtener información que puede ayudar a futuros estudios a identificar los roles de los diferentes microRNAs dentro del campo de la enfermedad, sus funciones y disfunciones, con el fin de generar conocimientos que permitan un mejor diagnóstico al paciente que padece la enfermedad.

Referencias Bibliográficas

- Acquatella, H., Asch, F. M., Co-chair, F., Barbosa, M. M., Barros, M., Bern, C., Marin-neto, J. A., Migliore, R., Milei, J., & Morillo, C. A. (2017). Recomendaciones para el uso de Diferentes Modalidades de Imágenes Cardíacas en Pacientes con Enfermedad de Chagas : *Reporte de la Sociedad Americana de Ecocardiografía en Colaboración con la Sociedad Interamericana de Ecocardiografía (ECOSIAC) y el Depa*. 31(1), 3–25.
- Alejandro Salomone, Ó. (2002). Los péptidos natriuréticos en la insuficiencia cardíaca: mejorando el diagnóstico y el manejo del síndrome. *Revista Española de Cardiología*, 55(1), 4–6. [https://doi.org/10.1016/s0300-8932\(02\)76546-9](https://doi.org/10.1016/s0300-8932(02)76546-9)
- Altclas, J., Arselán, S., Barcán, L., Diez, M., Gadano, A., Jacob, N., Maiolo, E., Nagel, C., Riarte, A., Rodriguez, V., Schiavelli, R., Schijman, A. G., Vigliano, C., & Lattes, R. (2010). Chagas' disease and solid organ transplantation. *Transplantation Proceedings*, 42(9), 3354–3359. <https://doi.org/10.1016/j.transproceed.2010.09.019>
- Al-Khatib, S. M., Stevenson, W. G., Ackerman, M. J., Bryant, W. J., Callans, D. J., Curtis, A. B., Deal, B. J., Dickfeld, T., Field, M. E., Fonarow, G. C., Gillis, A. M., Granger, C. B., Hammill, S. C., Hlatky, M. A., Joglar, J. A., Kay, G. N., Matlock, D. D., Myerburg, R. J., & Page, R. L. (2018). 2017 AHA/ACC/HRS guideline for management of patients with ventricular arrhythmias and the prevention of sudden cardiac death: Executive summary: A Report of the American College of Cardiology/American Heart Association Task Force on Clinical Practice Guidelines and the Heart Rhythm Society. *Heart Rhythm*, 15(10), e190–e252. <https://doi.org/10.1016/j.hrthm.2017.10.035>

- Amorim, S., Campelo, M., Moura, B., Martins, E., Rodrigues, J., Barroso, I., Maciel, M. J. (2017). The role of biomarkers in dilated cardiomyopathy: Assessment of clinical severity and reverse remodeling. *Revista Portuguesa de Cardiologia*, 36(10), 709–716. doi:10.1016/j.repc.2017.02.015
- Angelo-Mendoza, Elisa, Rodríguez-Bonfante, Claudina, Camacho, Ignacio, Martínez, Johana, Perdomo, Tania, Cabrera, Alejandro, & Bonfante-Cabarcas, Rafael. (2005). Pacientes con cardiomiopatía dilatada chagásica y cardiopatía no chagásica presentan niveles elevados del factor de necrosis tumoral alfa. *Investigación Clínica*, 46(3), 219-228. Recuperado en 21 de junio de 2022, de http://ve.scielo.org/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0535-51332005000300004&lng=es&tlng=es.
- Bao, M. H., Feng, X., Zhang, Y. W., Lou, X. Y., Cheng, Y., & Zhou, H. H. (2013). Let-7 in cardiovascular diseases, heart development and cardiovascular differentiation from stem cells. *International journal of molecular sciences*, 14(11), 23086–23102. <https://doi.org/10.3390/ijms141123086>
- Bernardo, B. C., Gao, X.-M., Tham, Y. K., Kiriazis, H, Winbanks, C. E., Ooi, J. Y. Y., et al. (2014). Silencing of miR-34a attenuates cardiac dysfunction in a setting of moderate, but not severe, hypertrophic cardiomyopathy. *PloS One* 9, e90337. doi: 10.1371/journal.pone.0090337
- Bocchi, E. A., Guimarães, G., Tarasoutshi, F., Spina, G., Mangini, S., & Bacal, F. (2009). Cardiomyopathy, adult valve disease and heart failure in South America. *Heart*, 95(3), 181–189. <https://doi.org/10.1136/hrt.2008.151225>

- Cao, Z., Jia, Y., & Zhu, B. (2019). BNP and NT-proBNP as Diagnostic Biomarkers for Cardiac Dysfunction in Both Clinical and Forensic Medicine. *International journal of molecular sciences*, 20(8), 1820. <https://doi.org/10.3390/ijms20081820>
- Chen, X., Ba, Y., Ma, L., Cai, X., Yin, Y., Wang, K., Guo, J., Zhang, Y., Chen, J., Guo, X., Li, Q., Li, X., Wang, W., Zhang, Y., Wang, J., Jiang, X., Xiang, Y., Xu, C., Zheng, P., ... Zhang, C. Y. (2008). Characterization of microRNAs in serum: A novel class of biomarkers for diagnosis of cancer and other diseases. *Cell Research*, 18(10), 997–1006. <https://doi.org/10.1038/cr.2008.282>
- Curtis, J. P., Sokol, S. I., Wang, Y., Rathore, S. S., Ko, D. T., Jadbabaie, F., Portnay, E. L., Marshalko, S. J., Radford, M. J., & Krumholz, H. M. (2003). The association of left ventricular ejection fraction, mortality, and cause of death in stable outpatients with heart failure. *Journal of the American College of Cardiology*, 42(4), 736–742. [https://doi.org/10.1016/S0735-1097\(03\)00789-7](https://doi.org/10.1016/S0735-1097(03)00789-7)
- Daniel Hines Chaves, K., Rebeca Zumbado Vásquez, D., & Valeria Castro Corrales, D. (2019). Enfermedad de chagas: afección cardíaca-Dr. In *Revista Médica Sinergia* (Vol. 4, Issue 5). <http://revistamedicasinergia.com>
- Echeverría, L. E., Rojas, L. Z., Calvo, L. S., Roa, Z. M., Rueda-Ochoa, O. L., Morillo, C. A., Muka, T., & Franco, O. H. (2017). Profiles of cardiovascular biomarkers according to severity stages of Chagas cardiomyopathy. *International Journal of Cardiology*, 227, 577–582. <https://doi.org/10.1016/j.ijcard.2016.10.098>
- Ferreira, L. R. P., Frade, A. F., Santos, R. H. B., Teixeira, P.C., Baron, M. A., Navarro, I. C., et al (2014). MicroRNAs miR-1, miR-133a, miR-133b, miR-208a and miR-208b are

- dysregulated in chronic chagas disease cardiomyopathy. *Int. J. Cardiol*, 175, 409-417. Doi: 10.1016/j.ijcard.2014.05.019
- Gaggin, H. K., & Januzzi, J. L., Jr (2013). Biomarkers and diagnostics in heart failure. *Biochimica et biophysica acta*, 1832(12), 2442–2450. <https://doi.org/10.1016/j.bbadis.2012.12.014>
- García-Vázquez, R., Gallardo Rincón, D., Ruiz-García, E., Meneses García, A., Hernández De La Cruz, O., Astudillo-De La Vega, H., & López-Camarillo, C. (2018). let-7d-3p is associated with apoptosis and response to neoadjuvant chemotherapy in ovarian cancer. *Oncology Reports*. doi:10.3892/or.2018.6366
- Gascón, J., Albajar, P., Cañas, E., Flores, M., Gómez i Prat, J., Herrera, R. N., Lafuente, C. A., Luciardi, H. L., Moncayo, Á., Molina, L., Muñoz, J., Puente, S., Sanz, G., Treviño, B., & Sergio-Salles, X. (2007). Diagnóstico, manejo y tratamiento de la cardiopatía chagásica crónica en áreas donde la infección por *Trypanosoma cruzi* no es endémica. *Revista Espanola de Cardiologia*, 60(3), 285–293. <https://doi.org/10.1157/13100280>
- Giménez, L. J., Mitelman, J. E., Piñeiro, D. J., Burgos, F. N., Sabra, A., Feitosa, G., de Oliveira Junior, W., Gervacio, F. N., Chamorro, F., Calderón, R. B., Aguirre, F., Andrade, F. R., Villarroel, J. U., Bulla Fernández, D., Linárez Ochoa, N. E., Barisani, L., Romero, A., González, M., Melnikov, V., ... Simeone, A. (2019). Actualización de diagnóstico y tratamiento de la insuficiencia cardíaca de etiología chagásica. *Insuf Card*, 14(3), 96–110. <http://www.insuficienciacardiaca.org>
- Hua C-C, Liu X-M, Liang L-R, Wang L-F and Zhong J-C (2022). Targeting the microRNA-34a as a Novel Therapeutic Strategy for Cardiovascular Diseases. *Front. Cardiovasc. Med.* 8:784044. doi: 10.3389/fcvm.2021.784044

- Hunt, P. J., Richards, A. M., Nicholls, M. G., Yandle, T. G., Doughty, R. N., & Espiner, E. A. (1997). Immunoreactive amino-terminal pro-brain natriuretic peptide (NT-PROBNP): a new marker of cardiac impairment. *Clinical endocrinology*, 47(3), 287–296. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2265.1997.2361058.x>
- Januzzi, J. L., Prescott, M. F., Butler, J., Felker, G. M., Maisel, A. S., ... McCague, K. (2019). Association of Change in N-Terminal Pro-B-Type Natriuretic Peptide Following Initiation of Sacubitril-Valsartan Treatment With Cardiac Structure and Function in Patients With Heart Failure With Reduced Ejection Fraction. *JAMA*, 322(11), 1085. doi:10.1001/jama.2019.12821
- Kolenda, T., Przybyła, W., Teresiak, A., Mackiewicz, A., & M. Lamperska, K. (2014). The mystery of let-7d – a small RNA with great power. *Współczesna Onkologia*, 5, 293–301. doi:10.5114/wo.2014.44467
- Kroman, A. M., & Patton, K. K. (2020). Sex-specific risk assessment of sudden cardiac death. In *Sex and Cardiac Electrophysiology* (pp. 775–785). Elsevier. <https://doi.org/10.1016/b978-0-12-817728-0.00070-x>
- Laugier, L., Ferreira, L., Ferreira, F. M., Cabantous, S., Frade, A. F., Nunes, J. P., Ribeiro, R. A., Brochet, P., Teixeira, P. C., Santos, R., Bocchi, E. A., Bacal, F., Cândido, D., Maso, V. E., Nakaya, H. I., Kalil, J., Cunha-Neto, E., & Chevillard, C. (2020). miRNAs may play a major role in the control of gene expression in key pathobiological processes in Chagas disease cardiomyopathy. *PLoS neglected tropical diseases*, 14(12), e0008889. <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0008889>

- Lin, R., Rahtu-Korpela, L., Szabo, Z., Magga, J., Juntila, J., & Kerkelä, R. (2022). miR-185-5p regulates the development of myocardial fibrosis. *Journal of Molecular and Cellular Cardiology*. <https://doi.org/10.1016/j.yjmcc.2021.12.011>
- Lona, J., Martínez, M., Alarcón, G., Rodas, A., & Bello, Julián. (2013). El factor de necrosis tumoral (TNF- α) en las enfermedades cardiovasculares: biología molecular y genética. *Gaceta médica de México*, 149(5), 521-530.
- Mady, C., Fernandes, F., Arteaga, E., Ramires, F. J. A., Buck, P. de C., Salemi, V. M. C., ... Dias, R. R. (2008). Níveis séricos de NT pro-BNP: relação com função sistólica e diastólica nas miocardiopatias e pericardiopatias. *Arquivos Brasileiros de Cardiologia*, 91(1). doi:10.1590/s0066-782x2008001300008
- Maisel, A. S., Krishnaswamy, P., Nowak, R. M., McCord, J., Hollander, J. E., Duc, P., Omland, T., Storrow, A. B., Abraham, W. T., Wu, A. H., Clopton, P., Steg, P. G., Westheim, A., Knudsen, C. W., Perez, A., Kazanegra, R., Herrmann, H. C., McCullough, P. A., & Breathing Not Properly Multinational Study Investigators (2002). Rapid measurement of B-type natriuretic peptide in the emergency diagnosis of heart failure. *The New England journal of medicine*, 347(3), 161–167. <https://doi.org/10.1056/NEJMoa020233>
- Maisel, A. S., Peacock, W. F., McMullin, N., Jesse, R., Fonarow, G. C., Wynne, J., & Mills, R. M. (2008). Timing of immunoreactive B-type natriuretic peptide levels and treatment delay in acute decompensated heart failure: an ADHERE (Acute Decompensated Heart Failure National Registry) analysis. *Journal of the American College of Cardiology*, 52(7), 534–540. <https://doi.org/10.1016/j.jacc.2008.05.010>

- Melman, Y. F., Shah, R., & Das, S. (2014). MicroRNAs in heart failure is the picture becoming less miRky? *Circulation: Heart Failure*, 7(1), 203–214. <https://doi.org/10.1161/CIRCHEARTFAILURE.113.000266>
- Miyamoto, S. D., Karimpour-Fard, A., Peterson, V., Auerbach, S. R., Stenmark, K. R., Stauffer, B. L., & Sucharov, C. C. (2015). Circulating microRNA as a biomarker for recovery in pediatric dilated cardiomyopathy. *The Journal of Heart and Lung Transplantation*, 34(5), 724–733. <http://dx.doi.org/10.1016/j.healun.2015.01.979>
- Montgomery, R. L., Hullinger, T. G., Semus, H. M., Dickinson, B. A., Seto, A. G., Lynch, J. M., et al. (2011). Therapeutic inhibition of miR-208a improves cardiac function and survival during heart failure. *Circulation* 124, 1537–1547. doi: 10.1161/CIRCULATIONAHA.111.030932
- Munoz Saravia, S. G., Haberland, A., Bartel, S., Araujo, R., Valda, G., Reynaga, D. D., Ramirez, I. D., Borges, A. C., Wallukat, G., Ziebig, R., & Schimke, I. (2013). Combined measurement of N-terminal pro-B-type natriuretic peptide and highly sensitive cardiac troponin T for diagnosis and monitoring of heart injury in chronic Chagas' disease. *Clinical Biochemistry*, 46(15), 1615–1618. <https://doi.org/10.1016/j.clinbiochem.2013.06.011>
- Nonanka, C. K. V., Macêdo C. T., Cayalcante, B. R. R., Alcântara, A. C., de Silva, D. N., Bezerra da, M. R., et al. (2019). Circulating miRNAs as potential biomarkers associated with cardiac remodeling and fibrosis in chagas disease cardiomyopathy. *Int. J Mol. Sci.* 20, E4064. doi: 10.3390/ijms20164064.
- Okamoto, E. E., Sherbuk, J. E., Clark, E. H., Marks, M. A., Gandarilla, O., Galdos-Cardenas, G., Vasquez-Villar, A., Choi, J., Crawford, T. C., Q, R., Fernandez, A. B., Colanzi, R., Flores-Franco, J. L., Gilman, R. H., & Bern, C. (2014). Biomarkers in Trypanosoma cruzi-Infected

- and Uninfected Individuals with Varying Severity of Cardiomyopathy in Santa Cruz, Bolivia. *PLoS Neglected Tropical Diseases*, 8(10).
<https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0003227>
- Organización Panamericana de la Salud, & Organización Mundial de la Salud. (2018). *Guía para el diagnóstico y el tratamiento de la enfermedad de Chagas*. Washington D.C.: OPS & OMS. Prognosis of decompensated advanced heart failure. *Arq Bras Cardiol*
- Pang, J. K. S., Phua, Q. H., & Soh, B. S. (2019). Applications of miRNAs in cardiac development, disease progression and regeneration. *Stem Cell Research and Therapy*, 10(1), 1–11.
<https://doi.org/10.1186/s13287-019-1451-2>
- Pereira-Barretto, A. C., Carlo, C. H., Cardoso, J. N., Ochiai, M. E., Lima, M. V., Curiati, M. C., Scipioni, A. R., & Ramires, J. A. (2013). Role of BNP levels on the prognosis of decompensated advanced heart failure. *Arquivos brasileiros de cardiologia*, 100(3), 281–287. <https://doi.org/10.5935/abc.20130066>.
- Peterlin A, Pocivavšek K, Petrovič D and Peterlin B (2020) The Role of microRNAs in Heart Failure: A Systematic Review. *Front. Cardiovasc. Med.* 7:161. doi: 10.3389/fcvm.2020.00161
- Pozo, Arleth & Jorquera, Alicia & Rodríguez-Urbaneja, Fernando & Romero, Leomery & Geraldino, Oscar & Cáceres-Cauro, Alfonso & Rosas-Martínez, María. (2014). Natriuretic peptide in patients with Chagas disease: Diagnostic utility in heart failure. *Investigación clínica*. 55. 321-31.
- Rassi, A., Rassi, A., & Marin-Neto, J. A. (2010). Chagas disease. *The Lancet*, 375(9723), 1388–1402. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(10\)60061-X](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(10)60061-X)

- Rauci, A., Macrì, F., Castiglione, S. et al. (2021). MicroRNA-34a: the bad guy in age-related vascular diseases. *Cell. Mol. Life Sci.* 78, 7355–7378. <https://doi.org/10.1007/s00018-021-03979-4>
- Rincon, M. Y., VandenDriessche, T., & Chuah, M. K. (2015). Gene therapy for cardiovascular disease: Advances in vector development, targeting, and delivery for clinical translation. *Cardiovascular Research*, 108(1), 4–20. <https://doi.org/10.1093/cvr/cvv205>
- Rojas, L., Gómez-Ochoa, S. A., Echeverría, L. E., Bautista-Niño, P.K., Hunziker, L., Eisenga, M. F., & Taulant Muka. (2022). Circulating DHEA-S levels and major cardiovascular outcomes in chronic Chagas cardiomyopathy: A prospective cohort study, *International Journal of Cardiology*, 349, 90-95, <https://doi.org/10.1016/j.ijcard.2021.11.054>.
- Romaine, S. P. R., Tomaszewski, M., Condorelli, G., & Samani, N. J. (2015). MicroRNAs in cardiovascular disease: An introduction for clinicians. *Heart*, 101(12), 921–928. <https://doi.org/10.1136/heartjnl-2013-305402>
- Rosas Andrade, Fernando., Vanegas, D. I., Cabrales, M. F., & Sociedad Colombiana de Cardiología y Cirugía Cardiovascular. (2007). *Enfermedad de chagas*. Sociedad Colombiana de Cardiología y Cirugía Cardiovascular.
- Rostagno C, Galanti G, Comeglio M, Boddi V, Olivo G, Gastone Neri Serneri G. (2000) Comparison of different methods of functional evaluation in patients with chronic heart failure. *Eur J Heart Fail.* Sep;2(3):273-80.
- Ruskoaho, H. (2003). Cardiac Hormones as Diagnostic Tools in Heart Failure. *Endocrine Reviews*, 24(3), 341–356. doi:10.1210/er.2003-0006
- Sacchetto, C., Mohseni, Z., Colpaert, R., Vitiello, L., De Bortoli, M., Vonhögen, I., Xiao, K., Poloni, G., Lorenzon, A., Romualdi, C., Bariani, R., Mazzotti, E., Daliento, L., Bauce, B.,

- Corrado, D., Thum, T., Rampazzo, A., de Windt, L. J., & Calore, M. (2021). Circulating miR-185-5p as a Potential Biomarker for Arrhythmogenic Right Ventricular Cardiomyopathy. *Cells*, 10(10), 2578. <https://doi.org/10.3390/cells10102578>
- Santangeli, P., dello Russo, A., Casella, M., Pelargonio, G., di Biase, L., & Natale, A. (2011). Left ventricular ejection fraction for the risk stratification of sudden cardiac death: Friend or foe? *Internal Medicine Journal*, 41(1 A), 55–60. <https://doi.org/10.1111/j.1445-5994.2010.02371.x>
- Seok, H. Y., Chen, J., Kataoka, M., Huang, Z. P., Ding, J., Yan, J., Hu, X., & Wang, D. Z. (2014). Loss of MicroRNA-155 protects the heart from pathological cardiac hypertrophy. *Circulation Research*, 114(10), 1585–1595. <https://doi.org/10.1161/CIRCRESAHA.114.303784>
- Talvani, A., Rocha, M. O., Cogan, J., Maewal, P., de Lemos, J., Ribeiro, A. L., & Teixeira, M. M. (2004). Brain natriuretic peptide and left ventricular dysfunction in chagasic cardiomyopathy. *Memorias do Instituto Oswaldo Cruz*, 99(6), 645–649. <https://doi.org/10.1590/s0074-02762004000600020>
- Vegter, E. L., van der Meer, P., de Windt, L. J., Pinto, Y. M., & Voors, A. A. (2016). MicroRNAs in heart failure: From biomarker to target for therapy. In *European Journal of Heart Failure* (Vol. 18, Issue 5, pp. 457–468). John Wiley and Sons Ltd. <https://doi.org/10.1002/ejhf.495>
- Wallukat, G., Muñoz Saravia, S. G., Haberland, A., Bartel, S., Araujo, R., Valda, G., Duchon, D., Diaz Ramirez, I., Borges, A. C., & Schimke, I. (2010). Distinct Patterns of Autoantibodies Against G-Protein-Coupled Receptors in Chagas' Cardiomyopathy and Megacolon. Their Potential Impact for Early Risk Assessment in Asymptomatic Chagas' Patients. *Journal of*

- the American College of Cardiology*, 55(5), 463–468.
<https://doi.org/10.1016/j.jacc.2009.06.064>
- Wong, L. L., Saw, E. L., Lim, J. Y., Zhou, Y., Richards, A. M., & Wang, P. (2019). MicroRNA Let-7d-3p Contributes to Cardiac Protection via Targeting HMGA2. *International journal of molecular sciences*, 20(7), 1522. <https://doi.org/10.3390/ijms20071522>
- World Health Organization (2014) *Chagas disease (American trypanosomiasis)*.
[https://www.who.int/es/news-room/fact-sheets/detail/chagas-disease-\(american-trypanosomiasis\)](https://www.who.int/es/news-room/fact-sheets/detail/chagas-disease-(american-trypanosomiasis))
- Xavier, Sergio & Sousa, Andréa & Hasslocher-Moreno, Alejandro. (2005). Application of the new classification of cardiac insufficiency (ACC/AHA) in chronic Chagas cardiopathy: A critical analysis of the survival curves. *Rev SOCERJ*. 18. 227-232.
- Yang, Y., Cheng, H. W., Qiu, Y., Dupee, D., Noonan, M., Lin, Y. D., Fisch, S., Unno, K., Sereti, K. I., & Liao, R. (2015). MicroRNA-34a Plays a Key Role in Cardiac Repair and Regeneration Following Myocardial Infarction. *Circulation research*, 117(5), 450–459.
<https://doi.org/10.1161/CIRCRESAHA.117.305962>
- Yu, M., Liang, W., Xie, Y., Long, Q., Cheng, X., Liao, Y.-H., & Yuan, J. (2016). Circulating miR-185 might be a novel biomarker for clinical outcome in patients with dilated cardiomyopathy. *Scientific Reports*, 6(1). doi:10.1038/srep33580
- Zhang, M., Meng, Q., Qi, X., Han, Q., Qi, X., Wang, F., & Du, B. (2018). Comparison of multiple biomarkers for mortality prediction in patients with acute heart failure of ischemic and nonischemic etiology. *Biomarkers in Medicine*, 12(11), 1207–1217.
<https://doi.org/10.2217/bmm-2018-0123>

Zhou, S. S., Jin, J. P., Wang, J. Q., Zhang, Z. G., Freedman, J. H., Zheng, Y., & Cai, L. (2018). MiRNAs in cardiovascular diseases: Potential biomarkers, therapeutic targets and challenges review-article. *Acta Pharmacologica Sinica*, 39(7), 1073–1084. <https://doi.org/10.1038/aps.2018.30>

Anexos

Anexo 1: *miRNeasy Serum/Plasma Advanced Kit* (Qiagen, Hilden, Alemania)

Protocolo de purificación de ARN:

1. Preparar muestras de suero
2. Agregar 5 volúmenes de QIAzol y mezclar en vortex o por pipeteo.
3. Colocar la muestra a temperatura ambiente (15-25°C) por 5 minutos.
4. Agregar 3,5 µl de miRNeasy Serum/Plasma Spike-In Control (1,6 x 10⁸ copias/µl de solución de trabajo) y mezclar bien.
5. Añada cloroformo en un volumen igual al de la muestra inicial al tubo que contiene el lisado y taponarlo firmemente. Agitar enérgicamente durante 15 s.
6. Colocar el tubo en la mesa de trabajo a temperatura ambiente por 2-3 minutos.
7. Centrifugar por 15 minutos a 12.000 x g a 4°C. Luego, calentar la centrifuga hasta llegar a temperatura ambiente.
8. Transferir la fase acuosa superior a un nuevo tubo de recogida. Evitar la transferencia de cualquier material de interfase. Añada 1,5 volúmenes de etanol al 100% y mezclar bien pipeteando arriba y abajo varias veces. No centrifugar. Continuar sin demora con el paso 9.
9. Pipetear hasta 700 µl de la muestra, incluido cualquier precipitado que se haya formado, en una columna de centrifugado RNeasy MinElute en un tubo de recogida de 2 ml (suministrado). Cierre la tapa suavemente y centrifugue a 8000 x g (10.000 rpm) durante 15 s a temperatura ambiente. Deseche el del flujo.
10. Repetir el paso 9 con el resto de la muestra. Descartar el flujo de la muestra.
11. Añadir 700 µl de Buffer RWT a la columna de centrifugado RNeasy MinElute. Cierre la tapa suavemente y centrifugar durante 15 s a 8000 x g (10.000 rpm) para lavar la columna. Deseche el flujo de la columna.
12. Pipetear 500 µl de Buffer RPE en la columna de centrifugado RNeasy MinElute. Cierre la tapa suavemente y centrifugar durante 15 s a 8000 x g (10.000 rpm) para lavar la columna. Deseche el flujo.

13. Pipetear 500 µl de etanol al 80% en la columna de centrifugado RNeasy MinElute. Cierre la tapa suavemente y centrifugue durante 2 minutos a $38000 \times g$ (310.000 rpm) para lavar la membrana de la columna de centrifugado membrana. Deseche el tubo de recogida con el flujo.
14. Colocar la columna de centrifugado RNeasy MinElute en un nuevo tubo de recogida de 2 ml (suministrado). Abra la tapa de la columna de centrifugación y centrifugue a máxima velocidad durante 5 minutos para secar la membrana. Deseche el tubo de recogida con el flujo.
15. Colocar la columna de centrifugado RNeasy MinElute en un nuevo tubo de recogida de 1,5 ml (suministrado). Añada 14 µl de agua libre de RNasa directamente en el centro de la membrana de la columna de centrifugado. Cierre la tapa suavemente y centrifugue durante 1 minuto a máxima velocidad para eluir el ARN.

Anexo 2: *Ist-Strand cDNA Synthesis Kit* (Agilent Technologies, Santa Clara, EE. UU.)

Reacción de poliadenilación:

Prepare las reacciones de poliadenilación añadiendo los siguientes componentes para separar tubos de microcentrífuga de 0,5 ml libres de RNasa:

Agua libre de RNasa para llevar el volumen final a 20 (incluyendo la polimerasa añadida en el paso 2)
4,0 l de tampón de polimerasa 5×
1,0 l de rATP (10 mM)
1,0 l de MnCl₂ 25 mM (opcional)
x l de ARN total (30 ng - 1 g)

1. Añadir 1 ul de polimerasa *E. coli* poly A a cada reacción y mezclar suavemente (no mezclar en vórtex). Centrifugue brevemente las reacciones para recoger el contenido en el fondo de los tubos.
2. Incubar a 37°C por 30 minutos
3. Incubar a 95°C por 5 minutos y transferir los tubos a cama de hielo inmediatamente.
4. Proceda a la purificación de ARN (si se incluyó MnCl₂) o a la síntesis de ADNc de primera cadena (si se omitió MnCl₂), o almacene las reacciones a -20°C. Para el almacenamiento a largo plazo, almacene las reacciones a -80°C.

Purificación de ARN: *Phenol-Chloroform Extraction and Ethanol Precipitation*

5. Para cada reacción agregue 80 µl de agua libre de RNAsas
6. Transfiera cada muestra a un tubo para centrifuga de 1.5ml
7. Agregar 100 µl de fenolcloroformo a cada muestra y mezclar en vortex
8. Dar un spin a las muestras en microcentrífuga a 14.000 g por 10 minutos a 4°C

9. Transferir la fase acuosa de cada tubo a un eppendorf nuevo de 1.5 con precaución de no mezclar las fases.
10. Agregar un volumen igual de cloroformo a cada muestra y mezclar en vortex
11. Mezclar las muestras en microcentrífuga a 14.000 g por 10 minutos a 4°C.
12. Transferir la fase acuosa de nuevo a un eppendorf de 1.5 ml nuevo sin mezclar las fases.
13. Agregar 0.5 µl de glicógeno 20mg/ml y 10 µl de NaOAc 3M, pH 5.2.
14. Mezclar por inversión y agregar 300 µl de etanol al 95% a cada muestra.
15. Mezclar en microcentrífuga a 14.000 g por 10 minutos a 4°C para que se forme el pellet de ARN.
16. Descartar el sobrenadante
17. Resuspender el ARN con 300 µl de etanol al 80% en cada tubo y mezclar por inversión.
18. Mezclar en microcentrífuga a 14.000 g por 10 minutos a 4°C para que se forme el pellet de ARN.
19. Descartar el sobrenadante
20. Secar el ARN en una centrifuga por 2-5 minutos sin dejar secar en exceso.
21. Resuspender el ARN en 10 µl de agua libre de RNAsas

Síntesis de cDNA:

22. Añadir agua hasta completar un total de 20 µl, 2 µl de *AffinityScript RT buffer*, 10 µl de ARN poliadenilado o 4 µl de reacción de poliadenilación, 0,8 µl de mezcla dNTP, 1 µl de RT adaptator primer y 1 µl de *AffinityScript RT/RNase Block enzyme mixture*
23. Mezclar las muestras (No vortex)
24. Incubar a 55°C por 5 minutos
25. Incubar por 15 minutos a 25°C.
26. Incubar a 42°C por 30 minutos para permitir que se realice la transcripción inversa.
27. Incubar las reacciones a 95°C por 5 minutos para terminar la transcripción inversa
28. Agregar hasta 208 µl de agua libre de RNAsas
29. Colocar las reacciones finales en hielo si se va a realizar la PCR de inmediato. De lo contrario, mantener a -20°C.

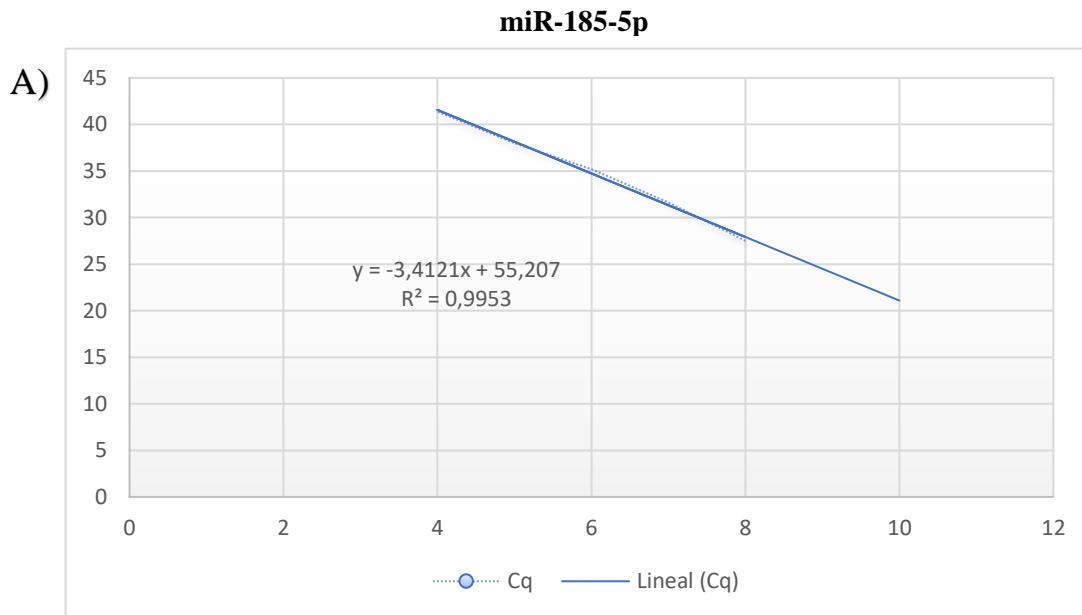
Anexo 3. Secuencias de primers forward diseñados a partir de secuencias maduras obtenidas en NCBS.

miRNA	Secuencia
hsa-miR-34a-5p	5'-TGGCAGTGTCTTAGCTGGTTGT-3'
hsa-miR-185-5p	5'-TGGAGAGAAAGGCAGTTCCTGA-3'
hsa-miR-7d-5p	5'-AGAGGTAGTAGGTTGCATAGTT-3'
has-miR-30d-5p	5'-TGTAACATCCCCGACTGGAAG-3'

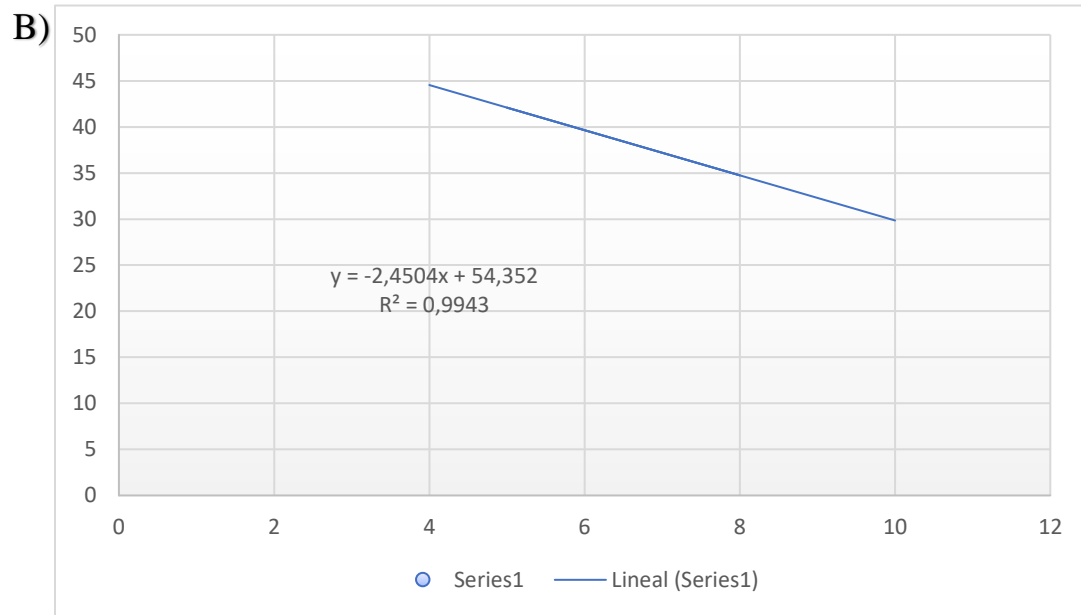
Anexo 4. Eficiencia de las qPCR para cada microARN evaluado.

miRNA	R2	Pendiente	Eficiencia de la qPCR (%)
34a-5p	0,996	-3,237	103,6
185-5p	0,995	-3,412	96,4
7d-5p	0,994	-2,45	155,9

Anexo 5. Curvas estándar y fórmulas de extrapolación del número de copias para cada microRNA. A) Curva estándar miR-185-5p, B) Curva estándar miR-let-7d, C) Curva estándar miR-34a-5p.



let-7d-5p



miR-34a-5p

