

## INTRODUCCIÓN Y ANTECEDENTES

La enfermedad de Chagas es una enfermedad desatendida causada por el protozooario intracelular *Trypanosoma cruzi*. Inicialmente, es una zoonosis de naturaleza tropical confinada a los países que van desde el cono sur hasta la región subtropical de los Estados Unidos, pero en los últimos años se ha diseminado en Europa y Asia como producto de las migraciones.

La enfermedad se caracteriza por una fase aguda, que normalmente es asintomática pero que puede en ocasiones generar insuficiencia cardíaca aguda, seguida por una fase indeterminada que puede durar entre 10-30 años, para ser finalmente, entre un 10 y un 30% de los pacientes, seguida por una fase crónica que puede caracterizarse por insuficiencia cardíaca y muerte súbita. Particularmente, la muerte súbita representa el 60% de la mortalidad en cualquier etapa, con víctimas habitualmente menores a 58 años y asintomáticas antes del episodio final.

Se han propuesto varios sistemas de estratificación para pacientes chagásicos, con la finalidad de desarrollar criterios que permitan identificar pacientes candidatos a muerte súbita. Algunos autores han postulado un sistema de clasificación que combina la ecocardiografía con la morfología del QRS y de la taquicardia ventricular. Otros sistemas se han enfocado en la respuesta de citoquinas por parte de los pacientes chagásicos. Algunos autores han reportado que niveles aumentados de IL-10 se asociaron con mejor rendimiento en la valoración de la fracción de eyección. En los mismos términos, el incremento de IFN y TNF y la disminución de IL-10 e IL-17 correlacionaron con la severidad de la cardiopatía chagásica. Se reportó en modelos experimentales que la IL-17 controla la resistencia a la enfermedad de Chagas aguda, regulando la diferenciación de células Th1, la producción de citoquinas y quimioquinas y el control de la miocarditis chagásica.

A pesar de estos antecedentes, existen pocos precedentes de marcadores pronósticos de muerte súbita. Nuestro grupo, en colaboración con el laboratorio de activación del sistema inmune del Centro de Biología Molecular “Severo Ochoa” ha demostrado el posible rol de la IL-2 como factor pronóstico para muerte súbita y de evolución de tratamiento en pacientes Chagásicos venezolanos. Por otro lado, los niveles de anticuerpos anti-sCha han demostrado correlación con la presentación de arritmias ventriculares en pacientes venezolanos y colombianos. En tal sentido, se propone determinar la correlación de los niveles de anticuerpos anti-sCha con los parámetros arrojados por tres pruebas de valoración cardiovascular, con la finalidad de identificar pacientes candidatos a tratamiento anti-arrítmico y/o la implantación de un desfibrilador.

## **OBJETIVOS GENERALES Y ESPECÍFICOS**

### **1. Objetivo general**

Determinar la correlación de marcadores sanguíneos de inflamación y/o autoinmunidad con el desarrollo de insuficiencia cardíaca y el riesgo de muerte súbita en pacientes chagásicos y modelos experimentales murinos.

### **2. Objetivos Específicos**

- a. Evaluar la correlación de los niveles de anticuerpos anti sCha con el estadiaje de las arritmias ventriculares según la clasificación de Lown, la presencia y el tipo de arritmias ventriculares, con el ancho del QRS y la presencia de cicatrices miocárdicas en pacientes chagásicos.
- b. Determinar la capacidad de unión a células cardíacas de los anticuerpos anti-sCha en modelos experimentales de infección murina

*in vivo* y *in vitro* y su correlación con los parámetros de electrocardiografía experimental.

## METODOLOGÍA

- a. **Sujetos de estudio.** Los sueros de los pacientes chagásicos serán recolectados, previo consentimiento informado, en el servicio de cardiología del Instituto de Medicina Tropical y de la Consulta externa de la facultad de Medicina de la Universidad Centroccidental “Lisandro Alvarado”. Los pacientes serán valorados clínicamente mediante un electrocardiograma de 24h (Holter), Resonancia magnética cardíaca y Ecografía doppler convencional, según parámetros clínicos de rutina y serán clasificados según el método de Carrasco et al para valorar los parámetros de insuficiencia cardíaca y según Lown para las arritmias.
- b. **Variables.** La susceptibilidad de los individuos y la distinta capacidad infectiva y patogénica de cada cepa de parásito, tiempo post infección y patología son variables que se tendrán en cuenta. Se recogerán las variables demográficas y las características clínico epidemiológicas correspondientes a cada paciente.
- c. **Modelo murino.** La valoración experimental del modelo de ratones infectados se realizará en las instalaciones del centro de Biofísica y Bioquímica del IVIC. Ratones Balb/c de 6-8 semanas serán infectadas con 1000 tripomastigotes por animal de la cepa YBM de *T. cruzi* (Tcl). Se valorará la parasitemia, el hematocrito, el electrocardiograma, las alteraciones de aprendizaje y conducta durante la infección experimental aguda. Los animales serán valorados hasta el día 21 post-

infección, donde serán sacrificados. Se extraerá muestras de sangre, suero, corazón e hígado para la valoración de citoquinas inflamatorias, infiltrado celular, carga parasitaria y marcadores de activación entre los diferentes grupos.

- d. **Recogida y análisis de datos.** Los datos clínicos de los pacientes se archivarán en los hospitales de origen siendo los datos analizados al finalizar el estudio mediante programas informáticos de estadística (GraphPad Prism y SPSS).
- e. **Reactividad de los sueros de los pacientes frente al autoantígeno Cha.** Los sueros serán testados mediante ELISA con el autoantígeno recombinante sCha. Placas de 96 pocillos Maxisorp (Nunc) se antigenizarán con 5 µg de autoantígeno Cha en PBS a 4°C durante 18h. Se neutralizarán las uniones no específicas con solución de bloqueo (PBS 3% leche en polvo (peso/volumen), 1% Tween-20). A continuación se incubarán diluciones 1:100 de los sueros durante 1h a temperatura ambiente. Se realizarán 3 lavados con solución de lavado (PBS 1% Tween-20), y se incubarán los pocillos 1h a temperatura ambiente con anticuerpo contra IgG humana acoplado a peroxidasa de rábano (HRPO, Pierce) diluído 1: 10000. Tras 3 lavados con solución de lavado se incubará con el sustrato OPD (Sigma) para su revelado. Las placas se medirán las densidades ópticas en un espectrofotómetro de placas de 96 pocillos a 450 nm.

## **BIBLIOGRAFÍA**

### **Publicaciones**

- A. Rodríguez-Angulo, H, Toro-Mendoza, Marques, J, Bonfante-Cabarcas, R, Mijares, A. **Induction of chagasic-like arrhythmias in the isolated beating**

**hearts of healthy rats perfused with T. cruzi-conditioned medium.** Brazilian Journal of Medical and Biological Research, 46(1):58-64. 2013.

- B. Rodríguez-Angulo, H., García, O., Cárdenas, E., Castillo, E., Marques, J., Mijares, A. **Administration of Etanercept produces low QRS voltage and autonomic dysfunction during the acute phase of experimental infection with Trypanosoma cruzi.** Arquivos Brasileiros de Cardiologia;101(3):205-210.
- C. Rodríguez-Angulo H, Thomas LE, Castillo E, Cárdenas E, Mogollón F, Mijares AJ. **Role of TNF in sickness behavior and allodynia during the acute phase of Chagas' disease.** Experimental Parasitology, 134(4):422-429. 2013.
- D. Rodriguez HO, Guerrero NA, Fortes A, Santi-Rocca J, Gironès N, Fresno M. **Trypanosoma cruzi strains cause different myocarditis patterns in infected mice.** Acta Trop. 2014; 139C:57-66.
- E. Rodríguez H et al. **Evidence of reversible bradycardia and arrhythmias caused by immunogenic proteins secreted by T. cruzi in isolated rat hearts.** Plos Neglected Tropical Disease. 2015, 3;9(2):e0003512. doi: 10.1371/journal.pntd.0003512.
- F. **Rodríguez-Angulo H,** Differential cytokine profiling in Chagasic patients according to their arrhythmogenic-status. Rodríguez-Angulo H, Marques J, Mendoza I, Villegas M, Mijares A, Gironès N, Fresno M. BMC Infect Dis. 2017 Mar 21;17(1):221.