



UNIVERSIDAD DE CHILE
FACULTAD DE CIENCIAS VETERINARIAS Y PECUARIAS
ESCUELA DE CIENCIAS VETERINARIAS

**Rol del receptor RAGE en la patogénesis de la cardiopatía
chagásica crónica en un modelo *in vivo* murino**

Daniela Paz Osses Silva

Memoria para optar al Título Profesional de
Médico Veterinario
Departamento de Medicina Preventiva Animal

PROFESOR GUÍA: Dr. Christian Castillo Rivas
Instituto de Ciencias Biomédicas, Facultad de Medicina, Universidad de Chile

Financiamiento: FONDECYT 3180452, 11220310.

SANTIAGO, CHILE
AÑO 2023



UNIVERSIDAD DE CHILE
FACULTAD DE CIENCIAS VETERINARIAS Y PECUARIAS
ESCUELA DE CIENCIAS VETERINARIAS

**Rol del receptor RAGE en la patogénesis de la cardiopatía
chagásica crónica en un modelo *in vivo* murino**

Daniela Paz Osses Silva

Memoria para optar al Título Profesional de
Médico Veterinario
Departamento de Medicina Preventiva Animal

NOTA FINAL:

NOTA:

FIRMA:

PROFESOR GUÍA: CHRISTIAN CASTILLO

.....

.....

PROFESOR CONSEJERO: GALIA RAMÍREZ

.....

.....

PROFESOR CONSEJERO: LEONARDO SÁENZ

.....

.....

ÍNDICE DE CAPITULOS

ÍNDICE DE CAPITULOS.....	2
INDICE DE TABLAS	4
INDICE DE FIGURAS.....	5
RESUMEN	6
ABSTRACT.....	7
INTRODUCCIÓN	8
REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA	10
Manifestaciones clínicas de la enfermedad de Chagas	10
Fase aguda.....	10
Fase Crónica Indeterminada o Asintomática	11
Fase Crónica Determinada o Sintomática	11
Cardiopatía Chagásica Crónica (CCC)	11
Tratamiento	12
Respuesta inmune innata ante la infección por <i>T. cruzi</i>	12
HMGB1	12
RAGE	13
HIPÓTESIS.....	14
OBJETIVO GENERAL.....	14
OBJETIVOS ESPECÍFICOS	14
MATERIALES Y MÉTODOS.....	15
A. Metodología asociada a todos los objetivos del anteproyecto	15
1) Cultivo de células Vero:.....	15
2) Obtención de tripomastigotes de <i>T. cruzi</i> :	15
3) Infección en ratones:	15
3) Bioética y Bioseguridad.....	16
B. Metodología asociada al objetivo 1	16
1) Expresión de HMGB1, RAGE, IFN- γ y TNF- α :	16
2) RT-qPCR:	16
C. Metodología asociada al objetivo 2	17
1) Carga parasitaria:	17

D. Análisis estadístico	18
RESULTADOS.....	19
Caracterización de la infección crónica en el modelo murino	19
Mortalidad en fase aguda	19
Mortalidad en fase crónica y post tratamiento	19
Parasitemia post infección.....	20
Resultados del Objetivo N° 1 :	21
Los niveles de mRNA de HMGB1 y RAGE no son modificados por la infección con <i>T. cruzi</i> ni por el tratamiento farmacológico.....	21
El tratamiento con FPS-Zm1 revierte el aumento en los niveles de mRNA de IFN- γ , pero los niveles de TNF- α no son modificados por la infección o el tratamiento farmacológico	22
Resultados del Objetivo N° 2.....	23
“Determinar carga parasitaria, reclutamiento de leucocitos y daño histopatológico en respuesta al bloqueo farmacológico de la activación de RAGE en un modelo murino de infección crónica por <i>T. cruzi</i> ”	23
El bloqueo farmacológico de RAGE no disminuye la carga parasitaria en corazones de ratones con cardiopatía chagásica crónica.....	23
El tratamiento con FPS-Zm1 disminuye parcialmente el infiltrado leucocitario y las fibras de colágeno en el tejido cardiaco.....	24
DISCUSIÓN	27
BIBLIOGRAFÍA	29

INDICE DE TABLAS

TABLA 1. Oligonucleótidos usados como partidores para RT-qPCR específicos para mRNA	17
TABLA 2. Oligonucleótidos usados como partidores para RT-qPCR para determinar la carga parasitaria	18

INDICE DE FIGURAS

FIGURA 1. Tasa de supervivencia en ratones BALB/c infectados con <i>T. cruzi</i> en fase aguda.....	19
FIGURA 2. Tasa de supervivencia en ratones BALB/c infectados con <i>T. cruzi</i> post tratamiento.....	20
FIGURA 3. Parasitemia en ratones BALB/c infectados con <i>T. cruzi</i>	21
FIGURA 4. Niveles de transcrito de HMGB1 y RAGE en tejido cardiaco no son alterados por la infección con <i>T. cruzi</i> ni por los tratamientos.	22
FIGURA 5. Niveles de mRNA de citoquinas proinflamatorias en tejido cardiaco de ratones infectados con <i>T. cruzi</i> y tratados con FPS.	23
FIGURA 6. El tratamiento con FPS o Bz no disminuye la carga parasitaria en corazones de ratones con Cardiopatía Chagásica crónica.	24
FIGURA 7. FPS-Zm1 reduce parcialmente el infiltrado celular en el tejido cardiaco de ratones BALB/c infectados crónicamente con <i>T. cruzi</i>	25
FIGURA 8. FPS-Zm1 reduce parcialmente la fibrosis cardiaca en ratones BALB/c infectados crónicamente con <i>T. cruzi</i>	26

RESUMEN

La Enfermedad de Chagas es una parasitosis zoonótica causada por el protozoo *Trypanosoma cruzi*. Esta enfermedad es endémica de Latinoamérica y se ha distribuido por todo el mundo, debido a la migración poblacional. En la enfermedad de Chagas se distinguen dos fases clínicas: aguda y crónica; la fase aguda se caracteriza por ser asintomática en la mayoría de los casos y que, en ausencia de tratamiento avanza a la fase crónica. Es la Cardiopatía Chagásica Crónica (CCC) la complicación más grave de la fase crónica de la enfermedad, su incidencia aumenta con la edad, lo que causaría insuficiencia cardíaca y la muerte. Dentro de la respuesta inmune innata inflamatoria esta High Mobility Group Box 1 (HMGB1) que es un Patron Molecular Asociado a Daño (DAMPs) que se une al receptor de compuestos de glicosilación avanzada (RAGE) y que, en condiciones de inflamación crónica y sostenida, conduce al desarrollo y progresión de diferentes patologías. En la actualidad el tratamiento con Benznidazol (Bz) es incapaz de prevenir o revertir el daño cardíaco causado por el parásito. Frente a esto, en el presente trabajo se propone inhibir farmacológicamente al receptor RAGE utilizando el compuesto FPS-ZM1 en ratones Balb/c infectados con *T. cruzi*, los cuales fueron tratados farmacológicamente en diferentes grupos con Bz5 mg, Bz100 mg y con el inhibidor FPS-ZM1 durante 20 días. Al final del experimento se determinó los niveles de expresión cardíaca de RAGE, HMGB1, IFN- γ , TNF- α y carga parasitaria, como también el reclutamiento de leucocitos y el daño histopatológico en el tejido cardíaco del modelo murino. Los resultados no mostraron diferencias estadísticamente significativas con respecto a los grupos control sin infectar, también se observó que se reduce parcialmente el infiltrado leucocitario y fibrosis cardíaca, por lo que el inhibidor de RAGE, el compuesto FPS-ZM1, no sería mejor tratamiento que el actualmente utilizado frente a la enfermedad.

Palabras clave: *Trypanosoma cruzi*, C ardiopatía Chagásica Crónica, Enfermedad de Chagas, RAGE.

ABSTRACT

Chagas disease is a zoonotic parasitosis caused by the protozoan *Trypanosoma cruzi*. It is endemic to Latin America and has spread throughout the world due to population migration. In Chagas disease there are two clinical phases: acute and chronic. The acute phase is characterized by being asymptomatic in most cases and, in the absence of treatment, it progresses to the chronic phase. Chronic Chagasic Cardiopathy (CCC) is the most serious complication of the chronic phase of the disease, its incidence increases with age, causing heart failure and death. Within the inflammatory innate immune response is High Mobility Group Box 1 (HMGB1) which is a Damage-associated molecular patterns (DAMPs) that binds to the RAGE receptor and, under conditions of chronic and sustained inflammation, leads to the development and progression of different pathologies. At present, treatment with Benznidazole (Bz) is unable to prevent or reverse the cardiac damage caused by the parasite. In view of this, in the present work we propose to pharmacologically inhibit the receptor for advanced glycation end products (RAGE) receptor using the compound FPS-ZM1 in BALB/c mice infected with *Trypanosoma cruzi* which were pharmacologically treated in different groups with Bz5 mg, Bz100 mg and with the inhibitor FPS-ZM1 for 20 days. At the end of the experiment, the levels of cardiac expression of RAGE, HMGB1, IFN- γ and TNF- α and parasite load were determined, as well as the recruitment of leukocytes and histopathological damage in the cardiac tissue of the murine model. The results showed no statistically significant differences with respect to the uninfected control groups; it was also observed that the leukocyte infiltrate and cardiac fibrosis were partially reduced, so that the RAGE inhibitor, the compound FPS-ZM1, would not be a better treatment than that currently used to treat the disease.

INTRODUCCIÓN

La Enfermedad de Chagas es una enfermedad zoonótica causada por el parásito *Trypanosoma cruzi* y está presente en toda Latinoamérica. Según las últimas estimaciones realizadas por la OMS, casi 6 millones de personas están infectadas por *T. cruzi* en los 21 países endémicos, y debido a fenómenos migratorios, esta enfermedad se ha extendido a regiones no endémicas incluyendo Europa, Asia y Oceanía.

Trypanosoma cruzi se transmite a través del contacto con insectos triatominos que son hematófagos obligados, los cuales, al alimentarse de la sangre de un hospedero mamífero, depositan junto con las deyecciones la forma infectiva del parásito, ingresando dentro del huésped a través de la picadura o a través de membranas mucosas intactas como la conjuntiva y son liberados hacia el torrente sanguíneo donde alcanzan sus principales órganos blanco: sistema digestivo y corazón. Esta forma de transmisión constituye el principal mecanismo de transmisión, sin embargo, también existen otros mecanismos de transmisión no vectoriales que incluyen la transfusión sanguínea, trasplante de órganos, transmisión oral y la transmisión congénita.

En la enfermedad de Chagas se distinguen dos fases clínicas: aguda y crónica. La fase aguda de la infección dura entre 4-8 semanas y la fase crónica persiste durante toda la vida del hospedero. La fase aguda puede ser asintomática, o con síntomas inespecíficos como un cuadro clínico severo. Las manifestaciones agudas de la infección por *T. cruzi* desaparecen de forma espontánea en casi todos los enfermos, dando paso a la fase crónica indeterminada o asintomática. En la fase crónica determinada o sintomática se describen principalmente megasíndromes digestivos, como el megaesófago y el megacolon, y una cardiopatía. La Cardiopatía Chagásica Crónica (CCC) es la complicación más grave de la fase crónica de esta enfermedad y su incidencia aumenta con la edad. Se define como una miocarditis crónica o un estado de inflamación progresiva, que con el tiempo conduce a un cuadro de fibrosis miocárdica y que puede desencadenar espontáneamente a arritmia ventricular.

En el hospedero la respuesta inmune innata provee la primera línea de defensa contra infecciones, y ante procesos patológicos, las células pueden generar señales de peligro endógenas conocidas como patrones moleculares asociados a daño (DAMPs, del inglés *Damage-associated molecular patterns*). Los DAMPs, son proteínas intracelulares que cuando son liberadas al medio extracelular constituyen señales de peligro, los cuales son capaces de inducir quimiotaxis y desencadenar una respuesta proinflamatoria. De estas, la

mejor caracterizada es la molécula conocida como HMGB1 (del inglés *High Mobility Group Box 1*). La activación de la respuesta inmune por HMGB1 se produce específicamente por la unión a receptores de reconocimiento de patógenos (PRRs) tales como el receptor de compuestos de glicosilación avanzada (RAGE, del inglés *Receptor for advanced glycation end products*) y receptores tipo Toll (TLRs, del inglés *Toll-like Receptors*). RAGE es un receptor de transmembrana perteneciente a la superfamilia de las inmunoglobulinas, que se expresa en múltiples tipos celulares como endotelios, linfocitos T y monocitos/macrófagos. El complejo HMGB1/RAGE activa a vías de transducción de señales y factores de transcripción, incluyendo al factor nuclear kB (NF-kB), que tiene un rol central en el establecimiento de la respuesta inmune innata inflamatoria que, en condiciones de inflamación crónica y sostenida, conduce al desarrollo y progresión de estados patológicos que incluyen diabetes mellitus, enfermedades cardiovasculares, Alzheimer y enfermedades inmunitarias/inflamatorias.

En esta memoria de título se propone estudiar el rol del receptor RAGE en la patogénesis de la CCC en un modelo *in vivo* murino.

REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

La Enfermedad de Chagas es una enfermedad zoonótica causada por el parásito *T. cruzi* y considerada, por la Organización Mundial de la Salud, como una enfermedad tropical desatendida. Es endémica en 21 países de Latinoamérica y se estima que aproximadamente 6 a 7 millones de personas están infectadas (WHO, 2015). Debido a la migración de personas desde Latinoamérica, la enfermedad de Chagas se ha extendido hacia países no endémicos como Canadá, Japón, Australia, Nueva Zelanda y España (Requena-Méndez *et al.*, 2015).

Trypanosoma cruzi es un parásito protozoo flagelado perteneciente al orden Kinetoplastidae y a la familia Trypanosomatidae, que presenta gran diversidad genética, biológica y bioquímica (Zingales, 2018). El ciclo de vida del parásito es complejo e incluye insectos vectores de la subfamilia Triatominae, los cuales, al alimentarse de la sangre de un hospedero mamífero, depositan junto con las deyecciones tripomastigotes, la forma infectiva del parásito. En el hospedero mamífero, los tripomastigotes pueden invadir cualquier célula nucleada, dentro de la cual se diferencian a la forma replicativa intracelular (amastigote), y luego de una serie de divisiones se diferencian nuevamente a tripomastigotes, lisan la célula y son liberados hacia la sangre donde alcanzan sus principales órganos blanco: sistema digestivo y corazón (Rassi *et al.*, 2010; Longo *et al.*, 2015).

Además de la transmisión vectorial (principal vía de transmisión), el parásito puede transmitirse por transfusión de sangre, trasplante de órganos, accidentes de laboratorio, transmisión oral y congénita, siendo algunas de estas las principales formas de infección de seres humanos en zonas urbanas y en países no endémicos (Murcia *et al.*, 2013).

Manifestaciones clínicas de la Enfermedad de Chagas

En la enfermedad de Chagas se distinguen dos fases clínicas: una fase aguda y otra fase crónica, siendo esta última subdividida en fase crónica indeterminada y fase crónica determinada (Rassi *et al.*, 2012).

Fase aguda

La fase aguda comprende desde el establecimiento de la infección hasta que la parasitemia detectada microscópicamente sea negativa. Las manifestaciones clínicas se inician entre 7 y 10 días post infección y consisten normalmente en síntomas leves e inespecíficos que se asemejan a un cuadro gripal. En la

mayor parte de los casos, la fase aguda pasa desapercibida. Ocasionalmente pueden aparecer lesiones cutáneas en el lugar de la inoculación (Molina *et al.*, 2016). La fase aguda habitualmente es asintomática en individuos inmunocompetentes y se resuelve espontáneamente en el 90% de los casos, incluso sin tratamiento (Rassi *et al.*, 2010).

Fase crónica indeterminada o asintomática

La fase crónica se inicia cuando la parasitemia desaparece y las pruebas serológicas son positivas (detección de IgG), lo que ocurre aproximadamente 1-2 meses después de la infección. Representa un 50 a 70% de todas las personas con enfermedad de Chagas. Se caracteriza por la ausencia de síntomas cardíacos, digestivos y otros (Molina *et al.*, 2016).

Fase crónica determinada o sintomática

Esta fase se caracteriza por una parasitemia baja y fluctuante, con títulos detectables de anticuerpos en pacientes inmunocompetentes. Alrededor de un 30% de los pacientes manifestarán signos de la fase crónica (Apt *et al.*, 2011). Las manifestaciones más relevantes de la fase crónica corresponden a megasíndromes, como: megacolon, megaesófago y cardiopatía chagásica crónica, enfermedad progresiva caracterizada por una respuesta inmunitaria inflamatoria continua que conduce a daño miocárdico y fibrosis (Apt *et al.*, 2011; Peixoto *et al.*, 2018).

Cardiopatía Chagásica Crónica (CCC)

En Chile y Brasil, la CCC corresponde al 30% de los casos, siendo la principal causa de discapacidad y mortalidad en estos individuos (Zingales *et al.*, 2012). En un comienzo la CCC puede ser asintomática, pero también puede estar acompañada de alteraciones electrocardiográficas, con síntomas como palpitaciones, disnea de esfuerzo y arritmias, siendo la insuficiencia cardíaca la progresión de la cardiopatía. En corazones dilatados se presentan fenómenos tromboembólicos que pueden ocasionar infartos pulmonares y cerebrales (Apt *et al.*, 2011). Existe fibrosis miocárdica focal o extensa, que originan microaneurismas de la punta del ventrículo izquierdo, lesión que resulta de la destrucción de las células del miocardio, debido a la acción directa del parásito, la respuesta inflamatoria y la afección neuronal (Zingales *et al.*, 2012).

Tratamiento

Los fármacos disponibles para el tratamiento etiológico de la enfermedad de Chagas son: nifurtimox y Benznidazol (Bz), cuya actividad anti-*T. cruzi* fue descubierta empíricamente hace más de 3 décadas (Murcia *et al.*, 2013). Ambos fármacos, presentan efectos secundarios, los que llevan a interrumpir el tratamiento. Estos son efectivos solo en la fase aguda y no son capaces de prevenir el desarrollo de la CCC (Morillo *et al.*, 2015).

Respuesta inmune innata ante la infección por *T. cruzi*

El reconocimiento de los patógenos invasores por parte del sistema inmune innato, además de ser la primera línea de defensa, es esencial para la protección del hospedero. Esta detección puede ocurrir tanto en células especializadas del sistema inmune, como en células no inmunes. Los patógenos poseen patrones moleculares asociados a estos (PAMPs) y como contraparte, las células presentadoras de antígeno del hospedero presentan receptores llamados Receptores de Reconocimientos de Patrones (PRRs). La activación de estos receptores promueve la síntesis de citoquinas y quimioquinas propias de la respuesta inmune (Dos-Santos *et al.*, 2016). Análogamente a los PAMPs, las moléculas endógenas con funciones inmunológicas se denominan DAMPs (Magna & Pisetsky, 2016). Los DAMPs son proteínas intracelulares, que cuando son liberadas al medio extracelular constituyen señales de peligro. Estos patrones de daños que son capaces de inducir quimiotaxis y desencadenar una respuesta proinflamatoria también se denominan alarminas. Dentro de las alarminas que se han descrito se encuentran: Heat Shock Proteins, proteínas S100, ácido úrico, ATP y proteínas nucleares como la HMGB1, siendo esta última la mejor caracterizada (Pradeu y Cooper, 2012; Magna y Pisetsky, 2016).

HMGB1

HMGB1 es una proteína nuclear altamente conservada que actúa como factor de unión a la cromatina, promoviendo la transcripción, reparación y recombinación del DNA, por lo que es clave para la proliferación y diferenciación celular (Kim *et al.*, 2021).

En presencia de infecciones o inflamación aguda, la activación de PRRs vía PAMPs promueve la translocación de HMGB1 hacia el citoplasma por la acetilación de los 2 sitios de localización nuclear (Lu *et al.*, 2014). Luego HMGB1 es liberada al medio extracelular, ya sea por lisis celular o por vía lisosomal dentro de exosomas, tanto por células del sistema inmune como por células no inmunes (ej, células

endoteliales, neuronas, condrocitos y células tumorales) (Yanai *et al.*, 2012). Ante una infección, la HMGB1 secretada se comporta como una citoquina proinflamatoria que estimula a monocitos y macrófagos promoviendo la síntesis de citoquinas clásicas de la respuesta contra patógenos intracelulares como TNF- α , IL-1 α , IL-1 β , IFN- γ , entre otras (Sangiuliano *et al.*, 2014). Los niveles de HMGB1 se encuentran elevados en diversas condiciones patológicas como cáncer, síndrome isquemia-reperusión, accidentes cerebrovasculares, infarto miocárdico y especialmente ante infecciones (Chan *et al.*, 2012).

RAGE

El receptor de compuestos de glicosilación avanzada (RAGE), es una proteína de membrana que pertenece a la superfamilia de receptores de inmunoglobulina. Los principales ligandos de RAGE son las HMGB1, las proteínas del grupo S100, los péptidos amiloides β , Mac-1 y beta-2 integrina (CD11b/CD18) (Mosquera, 2010). RAGE se ha reconocido en varias enfermedades con diferentes isoformas, RAGE completo, RAGE negativo dominante, RAGE N-truncado y RAGE soluble (sRAGE). Debido a su capacidad para reconocer una variedad de ligandos endógenos y exógenos estructuralmente no relacionados, RAGE se clasifica como PRR. La unión de RAGE con sus ligandos, activa una serie de eventos intracelulares que incluyen la activación del factor de transcripción NF- κ B llevando a la producción de citoquinas proinflamatorias que, en condiciones de inflamación crónica y sostenida, conduce al desarrollo y progresión de estados patológicos que incluyen diabetes mellitus, enfermedades cardiovasculares, Alzheimer y enfermedades inmunitarias/inflamatorias (Hudson *et al.*, 2018).

RAGE soluble, puede inhibir competitivamente la señalización mediada por ligandos de RAGE. Se ha sugerido que sRAGE puede competir con RAGE de membrana celular por la unión de los ligandos, evitando que estos ligandos se unan a sus receptores (incluido RAGE) y/o ejerzan efectos de otro modo. Así por ejemplo, la administración exógena de sRAGE redujo las respuestas inflamatorias en varios modelos animales, incluidos modelos de lesión hepática, aterosclerosis diabética, hipersensibilidad tipo IV, artritis inducida por colágeno tipo II y encefalomiелitis autoinmune experimental (Zoelen, 2011). sRAGE actúa como biomarcador y factor de protección endógeno, contra las patologías mediadas por RAGE. Se han desarrollado inhibidores moleculares pequeños para dirigirse al sitio de unión a ligandos extracelulares de RAGE y su vía de señalización intracelular (Kim *et al.*, 2021). Deane *et al.*, (2012) sintetizaron un compuesto, FPS-Zm1, como inhibidor que se une específicamente al dominio V de RAGE, es seguro y tiene un efecto protector en un modelo de neurodegeneración.

Tomando en consideración que: i) HMGB1 es capaz de activar la respuesta inmune innata inflamatoria, ii) que estos efectos se pueden revertir al inhibir la actividad de esta proteína o bloqueando su receptor RAGE, iii) que podría haber una relación entre la producción de HMGB1 y el establecimiento de la CCC, se propone en esta memoria de título la hipótesis a continuación descrita.

HIPÓTESIS

La inhibición farmacológica de la activación del receptor RAGE, modula la secreción de citoquinas proinflamatorias en un modelo de cardiopatía chagásica crónica murina.

OBJETIVO GENERAL

Estudiar el posible rol del receptor RAGE en la patogénesis de la cardiopatía chagásica, así como su potencial uso como blanco terapéutico.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS

1. Determinar los niveles de expresión cardiaca de RAGE, HMGB1, IFN- γ y TNF- α en respuesta al bloqueo farmacológico de la activación de RAGE en un modelo murino de infección crónica por *T. cruzi*.
2. Determinar carga parasitaria, reclutamiento de leucocitos y daño histopatológico en respuesta al bloqueo farmacológico de la activación de RAGE en un modelo murino de infección crónica por *T. cruzi*.

MATERIALES Y MÉTODOS

A. METODOLOGÍA ASOCIADA A TODOS LOS OBJETIVOS DEL ANTEPROYECTO

1) Cultivo de células Vero: Las células VERO® (ATCC® CCL-81), provenientes de fibroblasto de riñón de mono verde africano, se cultivaron en frascos de cultivo celular de 75 cm² con medio de cultivo Rosswell Park Memorial Institute 1640 (RPMI 1640, Gibco®) suplementado con bicarbonato de sodio (NaHCO₃) 2 mg/mL, estreptomicina 50 µg/mL, penicilina 50 UI/mL y enriquecido con suero fetal bovino inactivado (SFBi) al 5% a 37°C en un ambiente húmedo con 5% de CO₂, reemplazando el medio cada 24 o 48 horas (Salas et al., 2008).

2) Obtención de tripomastigotes de *T. cruzi*: Se obtuvieron tripomastigotes de la cepa Y (Ypsilon) a partir de cultivos de células VERO® previamente infectadas. Las células se cultivaron como se describió anteriormente; una vez en semi-confluencia se infectaron con 5 mL de medio con tripomastigotes provenientes de un cultivo anterior. Los parásitos invadieron las células y se replicaron intracelularmente como amastigotes, posterior a 72 horas los amastigotes se diferenciaron a tripomastigotes, lisaron las células y se liberaron al sobrenadante. Los tripomastigotes se aislaron mediante una doble centrifugación a baja velocidad (500 x g durante 5 minutos) para separar las células en suspensión y los detritos celulares y luego ese sobrenadante a alta velocidad (3500 x g durante 10 minutos) a fin de obtener las formas infectivas de *T. cruzi* en el sedimento. Finalmente, se resuspendieron los tripomastigotes en medio RPMI 1640 y se contaron en una cámara de Neubauer (Duaso et al., 2010; Liempi et al., 2014).

3) Infección en ratones: Se utilizó un modelo murino de CCC previamente establecido y validado (Molina et al., 2013a; Molina et al., 2013b; González-Herrera et al., 2017; Carrillo et al., 2021). Los animales utilizados fueron ratones macho BALB/c de 8 semanas de edad y 20-25g de peso, que se obtuvieron desde el Bioterio Central de la Facultad de Medicina de la Universidad de Chile. Estos se mantuvieron en un ambiente controlado, con ciclos de luz/oscuridad de 12 horas, con agua y alimento a libre disposición. Para la manipulación de los animales se siguió la guía de referencia: “*Guide for the care and use of laboratory animals*” (National Research Council., 2011). Los grupos de animales utilizados se dividieron en: a) Ratones control sin infectar, b) Ratones infectados con *T. cruzi*, c) Ratones infectados con *T. cruzi* y tratados con FPS-Zm1 (1 mg/kg/día) vía intraperitoneal, d) Ratones infectados con *T. cruzi* y tratados con Benznidazol (Bz, la droga usada actualmente para el tratamiento), dosis 5 mg/kg administrado por gavaje, e) Ratones infectados con *T. cruzi* y tratados con FPS-Zm1 (10mg/kg) y con Bz

(5 mg/kg). f) Ratones infectados con *T. cruzi* y tratados con Bz (100 mg/kg). Adicionalmente se consideró una condición de inoculación de los animales con el vehículo de FPS-Zm1: Suero Fisiológico NaCl 0,9% + DMSO 0,01% v/v vía intraperitoneal (i.p.).

Los tratamientos se realizaron entre los días 60 y 80 post-infección (p.i). En este modelo de infección se ha observado una mortalidad por la infección de entre un 20-50%, por lo que para tener un número de animales por grupo estadísticamente significativo se comenzó con 9 animales por grupo (54 animales en total). Para la infección se inocularon 500 tripomastigotes/animal i.p. La parasitemia de los animales infectados se siguió por observación directa de muestras de sangre obtenidas desde la cola del animal, el recuento de parásitos se realizó en una cámara de Neubauer y la sobrevivencia de los ratones se analizó mediante la construcción de una curva de Kaplan-Meier. Los animales sobrevivientes fueron eutanasiados al día 120 p.i. mediante la administración i.p. de ketamina/xilazina (150 mg/kg y 30 mg/kg, respectivamente), y se procesaron los corazones de todos los grupos para la extracción de RNA para el análisis de carga parasitaria y mRNA para la cuantificación de la expresión de RAGE, HMGB1, TNF- α e IFN- γ .

3) Bioética y Bioseguridad: El protocolo experimental se encuentra aprobado por el comité de bioética sobre investigación en animales de la Facultad de Medicina de la Universidad de Chile **MED-UCH 18121** (CBA 0999 FMUCH). La supervisión de los animales, procedimientos de eutanasia y manipulación de las formas infectivas del parásito se realizaron por el director de esta Memoria de Título (Anexo1). El protocolo de manejo de las formas infectivas y los desechos químicos se encuentra aprobado por la Unidad de Prevención de Riesgos de la Facultad de Medicina de la Universidad de Chile (Anexo2).

B. METODOLOGÍA ASOCIADA AL OBJETIVO 1

1) Expresión de HMGB1, RAGE, IFN- γ y TNF- α : La expresión de HMGB1, RAGE, IFN- γ y TNF- α se determinó mediante RT-qPCR, para medir los niveles de transcrito a nivel cardiaco.

2) RT-qPCR: Los corazones murinos fueron homogeneizados y se extrajo el RNA total usando el sistema comercial TRIzol (SigmaAldrich®) de acuerdo con las instrucciones del fabricante. El cDNA se sintetizó a partir de 1 μ g de RNA total mediante transcripción inversa con el sistema comercial M-MLV Reverse Transcriptase (Invitrogen®). Los niveles de transcrito de HMGB1, RAGE, TNF- α e IFN- γ se determinaron mediante PCR en tiempo real, para lo cual se utilizaron los partidores de la **Tabla 1** (Carrillo *et al.*, 2021).

Tabla 1. Oligonucleótidos usados como partidores para RT-qPCR específicos para mRNA

Partidores qPCR	Primer Forward	Primer Reverse
HMGB1	ATTGCTGCCTACAGAGCTAAA	CTTCATCCTCCTCATCATCTTCC
RAGE	GAAGGAGGTCAAGTCCAACACTAC	CACGAGTGTTTCTTTGCCATC
TNF-α	TAGCCACGTCGTAGCAAAC	ACAAGGTACAACCCATCGGC
IFN-γ	AACTGGCAAAGGATGGTGAC	TTGCTGATGGCCTGATTGTC
<i>mm</i>GAPDH	CTAGGACTGGATAAGCAGGGC	GCCAAATCCGTTACACCGA

La cuantificación del mRNA de HMGB1, RAGE, TNF- α e IFN- γ se llevó a cabo en un volumen de reacción de 20 μ L conteniendo 10 η g/ μ L de mRNAs cDNA (producto de la transcripción inversa), 10 μ L del sistema comercial SensiFAST™ SYBR® Hi-ROX Kit (Bioline®), 1 μ L de cada partidor a 10 η M y 3 μ L de agua ultrapura libre de DNAsas. El programa de temperaturas utilizado en la qPCR consistió en una pre-incubación a 95°C durante 2 minutos, seguido de 40 ciclos de denaturación a 95°C durante 5 segundos y apareamiento a 60°C durante 30 segundos. Para finalizar se agregó una etapa de disociación que correspondió a 95°C durante 15 segundos, 60°C durante 1 minuto, 95°C durante 15 segundos y por último 60°C durante 15 segundos en un termociclador de Tiempo Real ABI-7300. Los datos se analizaron por medio del método de doble control comparativo ($\Delta\Delta$ Ct) (Castillo *et al.*, 2017) usando como gen *housekeeping* la expresión de la GAPDH de ratón.

C. METODOLOGÍA ASOCIADA AL OBJETIVO 2

1) Carga parasitaria: La carga parasitaria en los corazones de los ratones se determinó mediante RT-qPCR, cuantificando los niveles de mRNA de la GAPDH de *T. cruzi* utilizando los partidores de la **tabla 2**. La extracción de RNA, síntesis de cDNA, el programa de temperaturas utilizado en la qPCR y el análisis de los datos fue el mismo que se describió anteriormente.

Tabla 2. Oligonucleótidos usados como partidores para RT-qPCR para determinar la carga parasitaria

Partidores qPCR	Primer Forward	Primer Reverse
<i>Tc</i> GAPDH	ACTCCCACTCTTCCA	TCCACCACCCTGTTG
<i>mm</i> GAPDH	CTAGGACTGGATAAGCAGGGC	GCCAAATCCGTTACACCGA

D. Análisis estadístico

1) Los datos obtenidos se expresan como la mediana. La significancia estadística de los valores se evaluó mediante el *test* Kruskal-Wallis seguido por el *post-test* de Dunn. El análisis de sobrevivencia de los ratones se realizó mediante el método de análisis de sobrevida de Kaplan-Meyer. Se utilizó *el software* estadístico GraphPad Prism 8.0 (GraphPad Software, San Diego, EE. UU.) y se consideraron valores de $p \leq 0,05$ como estadísticamente significativos.

RESULTADOS

CARACTERIZACIÓN DE LA INFECCIÓN CRÓNICA EN EL MODELO MURINO

Con el fin de poder validar el correcto establecimiento de la infección crónica en este modelo murino para CCC, se determinó la supervivencia de los ratones BALB/c infectados con *T. cruzi* así como la progresión de la parasitemia.

Mortalidad en fase aguda

Se observa una tasa de supervivencia de los ratones BALB/c infectados con *T. cruzi*, de un 80% en la fase aguda post infección, no se observan animales muertos en el grupo sin infección (**figura 1**). La cantidad de animales que sobrevivieron a la infección hasta el día 60 p.i. permitió hacer los grupos de las distintas condiciones experimentales con un número de animales suficiente para que los resultados fueran estadísticamente representativos.

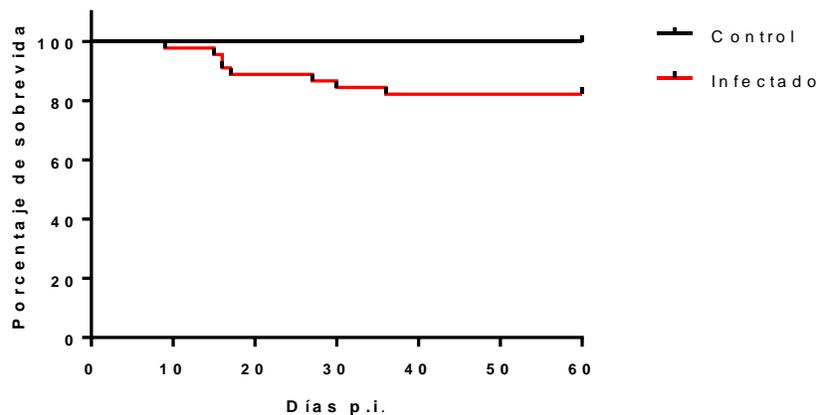


Figura 1. Tasa de supervivencia en ratones BALB/c infectados con *T. cruzi* en fase aguda. El gráfico muestra la curva de supervivencia de Kaplan-Meier, los datos representan el porcentaje de individuos supervivientes luego del final de la etapa aguda, el análisis estadístico corresponde a un *test* de Log-rank (Mantel-Cox).

Mortalidad en fase crónica y post tratamiento

El porcentaje de supervivencia *post* tratamiento fue de un 71,4% para los ratones infectados y tratados con Bz 100 (mg/kg) y de un 80% para los ratones del grupo vehículo (**figura 2**), en todas las otras condiciones se obtuvo un porcentaje de supervivencia del 100% *post* tratamiento.

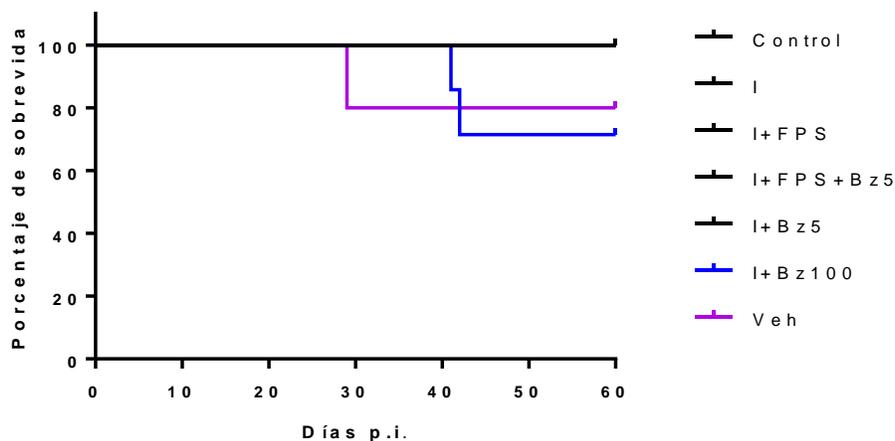


Figura 2. Tasa de supervivencia en ratones BALB/c infectados con *T. cruzi* post tratamiento. El gráfico muestra la curva de supervivencia, los datos representan el porcentaje de individuos supervivientes en cada día de observación y el análisis estadístico corresponde a un *test* de Log-rank (Mantel-Cox). I: infectado, FPS: FPS-Zm1, Bz5: Benznidazol 5 mg/kg, Bz100: Benznidazol 100 mg/kg, Veh: vehículo.

Parasitemia post infección

En relación con la progresión de la parasitemia (**figura 3**) se pudo observar que se detectaron tripomastigotes de *T. cruzi* en sangre desde el día 5 hasta el día 33 post infección, teniendo un *peak* de tripomastigotes en sangre el día 18 post infección, los cuales desaparecieron completamente de circulación al día 35.

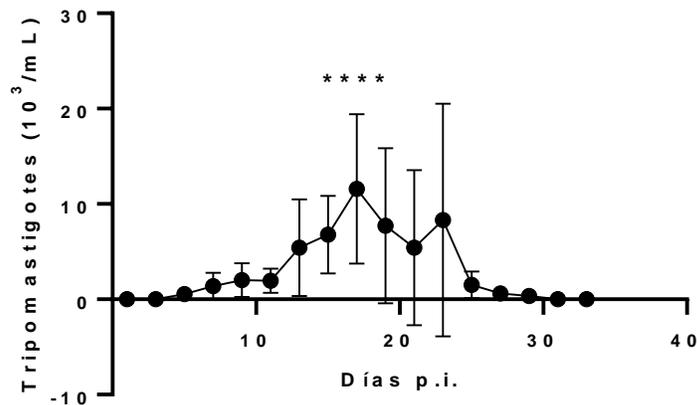


Figura 3. Parasitemia en ratones BALB/c infectados con *T. cruzi*. El gráfico muestra los niveles de parásitos en sangre de 15 animales por cada día de medición de la parasitemia. El recuento se hizo mediante observación directa en cámara Neubauer. Los datos se expresan como la media \pm SD. Se realizó un ANOVA de una vía para identificar diferencias significativas. **** $p \leq 0,0001$.

RESULTADOS DEL OBJETIVO N° 1 :

“Determinar los niveles de expresión cardiaca de RAGE, HMGB1, IFN- γ y TNF- α en respuesta al bloqueo farmacológico de la activación de RAGE en un modelo murino de infección crónica por *T. cruzi*”.

Los niveles de mRNA de HMGB1 y RAGE no son modificados por la infección con *T. cruzi* ni por el tratamiento farmacológico

La proteína nuclear HMGB1 tiene un rol clave en la proliferación y diferenciación celular (Kim *et al.*, 2021), al ser secretada es un ligando del receptor RAGE (Mosquera, 2010), cuya unión promueve la síntesis de citoquinas clásicas de respuesta contra patógenos intracelulares (Sangiuliano *et al.*, 2014). Los ratones BALB/c se infectaron con *T. cruzi* y posteriormente se trataron con FPS-Zm1 y Benznidazol a distintas concentraciones. Tanto los niveles de transcrito de HMGB1 como de RAGE muestran una tendencia al aumento en los niveles de mRNA, pero estas diferencias no son estadísticamente significativas con respecto al control sin infectar (**figura 4A y 4B**).

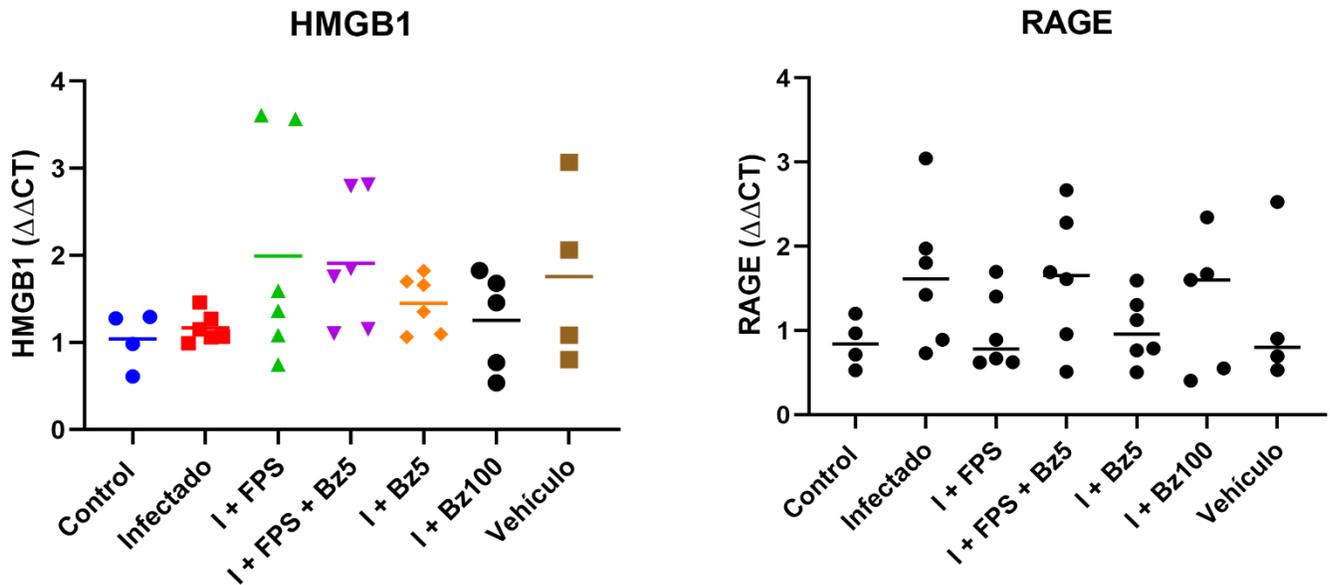


Figura 4. Niveles de transcrito de HMGB1 y RAGE en tejido cardiaco no son alterados por la infección con *T. cruzi* ni por los tratamientos. Niveles de mRNA de (A) HMGB1 y (B) RAGE obtenidos a partir de tejido cardiaco de ratones BALB/c con CCC, tratados con FPS, FPS + Bz5 (mg/kg), Bz5 (mg/kg) o Bz100 (mg/kg) a los 120 d.p.i. El mRNA de HMGB1 y RAGE se detectó mediante RT-qPCR. Todos los valores se expresan como la mediana, los datos se evaluaron por medio del método del doble control comparativo y se analizaron mediante el *test* Kruskal-Wallis y *post-test* de Dunnett. I: infectado, FPS: FPS-Zm1, Bz5: Benznidazol 5 mg/kg, Bz100: Benznidazol 100 mg/kg.

El tratamiento con FPS-Zm1 revierte el aumento en los niveles de mRNA de IFN- γ , pero los niveles de TNF- α no son modificados por la infección o el tratamiento farmacológico

El efecto del bloqueo farmacológico de la activación de RAGE en el modelo murino de infección crónica por *T. cruzi* se evaluó midiendo los niveles de mRNA de citoquinas proinflamatorias como TNF- α e IFN- γ a los 120 días post-infección (correspondiente a 40 días post término del tratamiento). Los niveles de transcrito de IFN- γ aumentaron en los ratones infectados con *T. cruzi* (19,5 veces con respecto al control ($p \leq 0,05$)), aumento que se revierte en los ratones tratados con FPS-Zm1 como en los tratados con Bz100, caso contrario a lo que se observó en los ratones tratados con FPS-Bz5 y Bz5 donde aumentan los niveles de mRNA 19,7 y 18 veces con respecto al control, respectivamente (**Figura 5A**). Por otro lado, como se observa en la **figura 5B**, no hay diferencias significativas en los niveles de transcrito de TNF- α entre las distintas condiciones de ratones infectados, infectados tratados con FPS-Zm1, infectados tratados con

FPS-Zm1 más Benznidazol 5 (mg/kg), infectados tratados con Benznidazol 5 (mg/kg) e infectados más Benznidazol 100 (mg/kg) con respecto al control sin infectar.

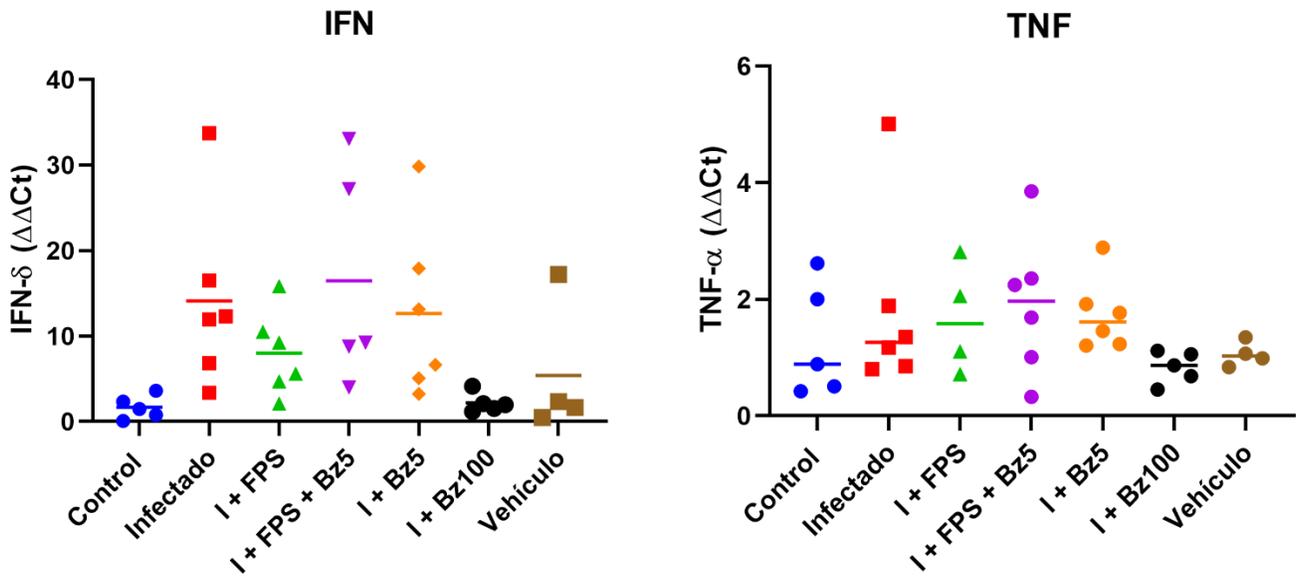


Figura 5. Niveles de mRNA de citoquinas proinflamatorias en tejido cardíaco de ratones infectados con *T. cruzi* y tratados con FPS-ZM1. Niveles de RNA mensajero de (A) IFN γ y (B) TNF α obtenidos a partir de tejido cardíaco de ratones BALB/c con CCC, tratados con FPS, FPS + Bz5 (mg/kg), Bz5 (mg/kg) o Bz100 (mg/kg) a los 120 d.p.i. El mRNA de IFN γ y TNF α se detectó mediante RT-qPCR. Todos los valores se expresan como la mediana, los datos se evaluaron por medio del método del doble control comparativo y se analizaron mediante el *test* Kruskal-Wallis y *post-test* de Dunnett. * $p \leq 0,05$. I: infectado, FPS: FPS-Zm1, Bz5: Benznidazol 5 mg/kg, Bz100: Benznidazol 100 mg/kg.

RESULTADOS DEL OBJETIVO N° 2

“Determinar carga parasitaria, reclutamiento de leucocitos y daño histopatológico en respuesta al bloqueo farmacológico de la activación de RAGE en un modelo murino de infección crónica por *T. cruzi*”

El bloqueo farmacológico de RAGE no disminuye la carga parasitaria en corazones de ratones con CCC.

La presencia del parásito es la principal determinante de los procesos inflamatorios inducen el daño cardíaco. Se determinó la carga parasitaria en el tejido cardíaco en respuesta a los distintos tratamientos ensayados. Para ello, se amplificó el mRNA de la GAPDH de *T. cruzi* y de GAPDH de *Mus musculus*

como gen *housekeeping* mediante RT-qPCR para cuantificar la cantidad de parásitos en el tejido cardíaco a los 40 días posteriores al término del tratamiento. En la **figura 6** se observa que tanto el tratamiento con FPS-Zm1 como con Bz no reducen la carga de parásitos cardíacos en los ratones infectados con *T. cruzi*.

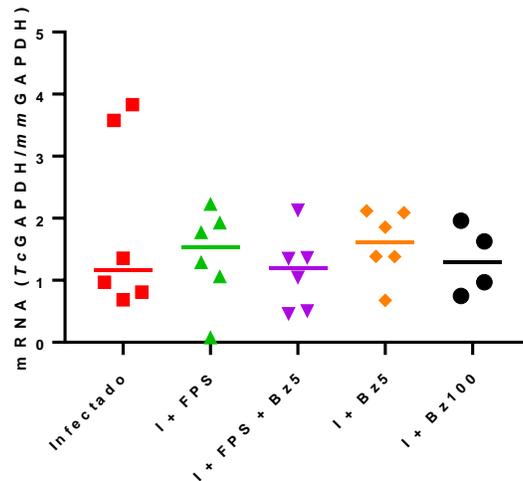


Figura 6. El tratamiento con FPS o Bz no disminuye la carga parasitaria en corazones de ratones con CCC. Niveles de mRNA de GAPDH de *T. cruzi* obtenidos a partir de tejido cardíaco de ratones infectados con *T. cruzi* y tratados con FPS, FPS + Bz5, Bz5 o Bz100 a los 120 d.p.i. El mRNA de *TcGAPDH* se detectó mediante RT-qPCR. Todos los valores se expresan como la mediana, los datos se evaluaron por medio del método del doble control comparativo y se analizaron mediante el *test* Kruskal-Wallis y *post-test* de Dunn. I: infectado, FPS: FPS-Zm1, Bz5: Benznidazol 5 mg/kg, Bz100: Benznidazol 100 mg/kg.

El tratamiento con FPS-Zm1 disminuye parcialmente el infiltrado leucocitario y las fibras de colágeno en el tejido cardíaco

En la CCC, la inflamación crónica es determinante en el deterioro de la arquitectura cardíaca. Por esto se evaluó el efecto de FPS-Zm1 sobre el infiltrado celular y la fibrosis local. Para ello se realizó un análisis histológico mediante tinción con hematoxilina-eosina (**figura 7**) en donde es posible identificar en el grupo infectado un infiltrado leucocitario focal moderado acompañado de una desorganización de la histoarquitectura cardíaca y como resultado del tratamiento con FPS-Zm1, Bz5 y Bz100 se observa una disminución parcial en el infiltrado leucocitario en el tejido.

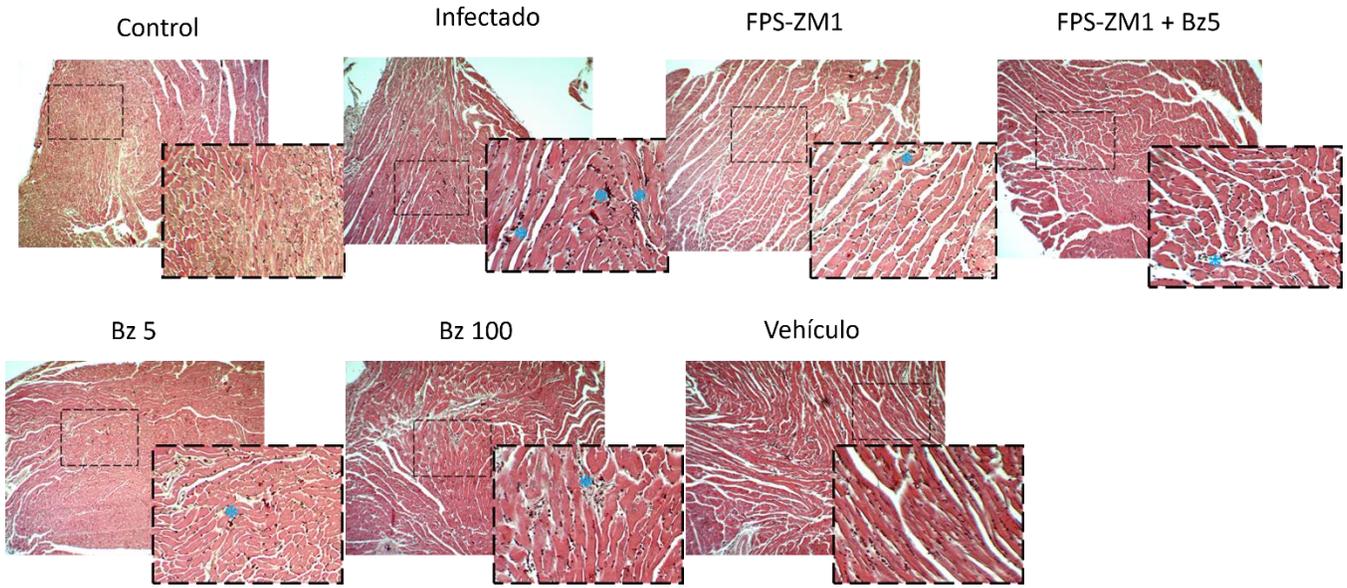


Figura 7. FPS-Zm1 reduce parcialmente el infiltrado celular en el tejido cardíaco de ratones BALB/c infectados crónicamente con *T. cruzi*. Imágenes representativas de tejido cardíaco teñidas con hematoxilina-eosina de ratones Balb/c infectados con *T. cruzi* y tratados con FPS-Zm1 o Benznidazol 5mg (Bz5) o Benznidazol 100 mg (Bz100). En las ampliaciones se destaca el área de reclutamiento de leucocitos (*).

Se analizó el efecto del bloqueo farmacológico de RAGE sobre la fibrosis cardíaca en el modelo de CCC. Mediante la tinción de Tricrómico de Masson (**Figura 8**) se identificó en el grupo infectado con *T. cruzi* fibras de colágeno teñidas de azul. Al igual que en la técnica histológica anterior, el tratamiento con FPS-Zm1, Bz5 y Bz100 disminuye parcialmente la fibrosis.

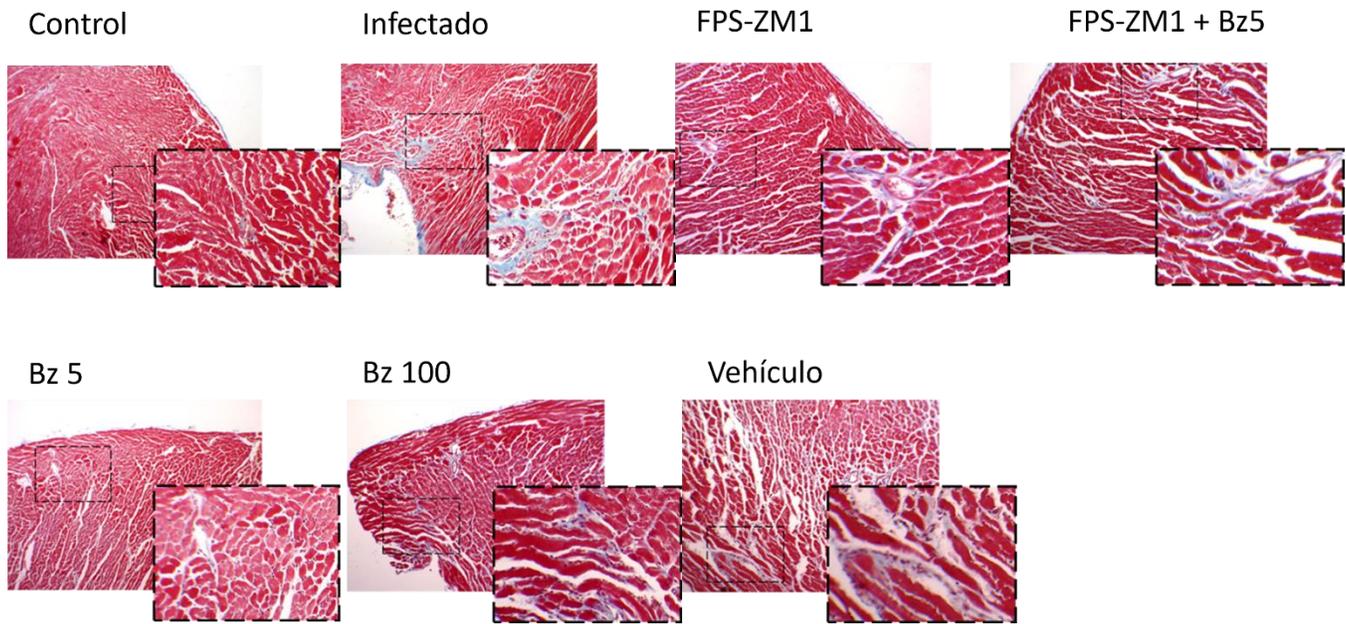


Figura 8. FPS-Zm1 reduce parcialmente la fibrosis cardiaca en ratones BALB/c infectados crónicamente con *T. cruzi*. Imágenes representativas de tejido cardíaco teñidas con Tricrómico de Masson en ratones BALB/c infectados con *T. cruzi* y tratados con Fps-Zm1 o Benznidazol 5mg o Benznidazol de 100 mg. En las ampliaciones se destaca el área de fibrosis.

DISCUSIÓN

La CCC corresponde a la principal causa de discapacidad y mortalidad en individuos con enfermedad de Chagas, a pesar de que su incidencia y prevalencia ha disminuido gracias a políticas de salud pública y control del vector (González-Herrera *et al.*, 2017). A pesar de los avances, su terapia farmacológica sigue siendo deficiente. El tratamiento principal en la fase crónica de la enfermedad es el Bz, el cual provoca una serie de efectos secundarios y no es capaz de prevenir el desarrollo de la CCC, por lo que es importante buscar nuevos blancos y estrategias terapéuticas (Morillo *et al.*, 2015).

En el presente estudio, las parasitemias y mortalidades observadas en fase aguda son similares a los estudios anteriores de modelos murinos de CCC previamente publicados (Molina *et al.*, 2013a; Molina *et al.*, 2013b; González-Herrera *et al.*, 2017; Carrillo *et al.*, 2021). Respecto a mortalidad post tratamiento, se observó un porcentaje de sobrevida de 71,4% en el grupo infectado con tratamiento de Bz 100 mg, esto sugiere que a dosis elevada de Bz contribuiría en los múltiples efectos secundarios descritos previamente del fármaco (Morillo *et al.*, 2015).

Un aspecto central para el desarrollo de la CCC es la persistencia de un estado inflamatorio, característico de la miocarditis que se traduce en daño estructural del miocardio (SHIM, 2011). En condiciones inflamatorias, la expresión de RAGE aumenta significativamente en células neuronales, células del músculo liso vascular y las vías respiratorias, las células endoteliales, entre otras (Singh *et al.*, 2022). Debido a la presencia de varios dominios (V, C1 y C2) en RAGE, puede unirse a diversas clases de ligandos, siendo el más estudiado HMGB1. Se ha demostrado que el complejo HMGB1/RAGE activa las vías de señalización inflamatoria que conducen a la progresión de diferentes patologías (Singh *et al.*, 2022). Dentro de estas citoquinas, destacan IFN γ y TNF α , que debido a la persistencia parasitaria y a la inflamación crónica de baja intensidad inducida por *T. cruzi*, serán producidas de forma continua las células del sistema inmune, por lo que van a desempeñar un papel central en la CCC (Nunes *et al.*, 2021). Estudios anteriores revelaron niveles más altos de IFN- γ y TNF- α en el tejido cardíaco de pacientes con CCC en comparación con otras miocardiopatías (Nunes *et al.*, 2021). En base a los antecedentes expuestos, se propuso que el bloqueo de este complejo podría ser un enfoque terapéutico para tratar enfermedades inflamatorias. En esta memoria, utilizamos el compuesto FPS-ZM1 como inhibidor de RAGE en ratones BALB/c infectados con *T. cruzi*. Es importante destacar que el compuesto no tiene acción tripanocida, por lo cual se debe utilizar en conjunto con Bz para un posible tratamiento de la CCC. El tratamiento farmacológico con FPS-ZM1 y BZ 5/100 mg en ratones infectados dio como resultado que

los niveles de mRNA para HMGB1 y RAGE muestran un leve aumento con respecto a nuestro grupo control sano y los niveles del mRNA de IFN- γ de los animales tratados con FPS-ZM1 disminuyen con respecto al grupo infectado, pero no así utilizando FPS-ZM1+BZ5 en donde aumentan los niveles del transcrito. Respecto a los niveles de mRNA de TNF- α en ratones infectados, no hubo diferencias en los distintos grupos. Así mismo, el bloqueo farmacológico de RAGE no disminuye la carga parasitaria en corazones de ratones con CCC. Por lo tanto, la combinación de FPS-ZM1 con Bz de 5mg o 100 mg no sería un tratamiento adecuado para la CCC, ya que si bien FPS-ZM1 disminuye los niveles de mRNA de RAGE, al utilizarse en conjunto con el antiparasitario tiene el efecto paradójico de que aumenta los niveles del transcrito, lo cual podría aumentar el daño cardiaco. En el caso de los niveles de mRNA de HMGB1, sería necesario estudiar los niveles secretados mediante la técnica de ELISA, ya que este DAMP ejerce su efecto pro inflamatorio mediante la unión a los distintos PRR, por lo que la cuantificación de mRNA no sería la metodología adecuada.

La manifestación patológica más recurrente en la CCC avanzada es la fibrosis, estudios previos han demostrado que Bz, además de sus propiedades tripanocidas, reduce los infiltrados de células inmunes y la producción de mediadores inflamatorios (Carrillo et al., 2021). A nivel cardiaco, pudimos observar, mediante la tinción de Hematoxilina Eosina y Tricrómico de Masson que existe un infiltrado leucocitario inflamatorio y un aumento en las fibras de colágeno en los ratones infectados con *T. cruzi*. En el caso de los grupos tratados farmacológicamente con FPS-ZM1 y Bz 5/100 mg podemos observar una leve disminución del infiltrado celular y fibrosis en el tejido, pero no se previene completamente. Lo anterior se puede explicar por la incapacidad de los tratamientos de regular los niveles de IFN- γ y TNF- α , que al estar en constante producción generan un microambiente inflamatorio que favorece el infiltrado de células inmunes, destrucción de las fibras miocárdicas y por consiguiente fibrosis reparativa (Nunes et al., 2021; Montalvo-ocotxtle *et al.*, 2022).

Finalmente, a partir de nuestros resultados es posible afirmar que en este modelo murino de CCC el inhibidor de RAGE el compuesto FPS-ZM1 no podría utilizarse en conjunto con el Bz como alternativa al tratamiento actual de la CCC, por lo que es necesario seguir en la búsqueda de nuevas estrategias terapéuticas para esta patología.

BIBLIOGRAFÍA

- APT, W.; HERNÁNDEZ, E.; JERSIC, M.; MUÑOZ, P.; HAUCK, I.; OLEA, A.; RIVERA, M.; TORRES, M.; ZULANTAY, I. 2011. Guía de diagnóstico, tratamiento y prevención de la enfermedad de Chagas. Ministerio de Salud, Gobierno de Chile. pp. 2-32.
- CARRILLO, I., RABELO, R. A. N., BARBOSA, C., RATES, M., FUENTES-RETAMAL, S., GONZÁLEZ-HERRERA, F., MAYA, J. D. 2021. Aspirin-triggered resolvin D1 reduces parasitic cardiac load by decreasing inflammation in a murine model of early chronic Chagas disease. *PLoS neglected tropical diseases*, 15(11), e0009978.
- CASTILLO, C., MUÑOZ, L., CARRILLO, I., LIEMPI, A., GALLARDO, C., GALANTI, N., MAYA, J. D., & KEMMERLING, U. 2017. Ex vivo infection of human placental chorionic villi explants with *Trypanosoma cruzi* and *Toxoplasma gondii* induces different Toll-like receptor expression and cytokine/chemokine profiles. *American Journal of Reproductive Immunology*, 78(1), 1–8.
- CHAN, J. K., ROTH, J., OPPENHEIM, J. J., TRACEY, K. J., VOGL, T., FELDMANN, M., NANCHAHAL, J. 2012. Alarmins: awaiting a clinical response. *The Journal of clinical investigation*, 122(8), 2711-2719.
- DEANE, R., SINGH, I., SAGARE, A. P., BELL, R. D., ROSS, N. T., LARUE, B., ZLOKOVIC, B. V. 2012. A multimodal RAGE-specific inhibitor reduces amyloid β -mediated brain disorder in a mouse model of Alzheimer disease. *The Journal of clinical investigation*, 122(4), 1377-1392.
- DOS-SANTOS, A. L. A., CARVALHO-KELLY, L. F., DICK, C. F., MEYER-FERNANDES, J. R. 2016. Innate immunomodulation to trypanosomatid parasite infections. *Experimental parasitology*, 167, 67-75.
- DUASO, J., ROJO, G., CABREBA, G., GALANTI, N., BOSCO, C., MAYA, J. D., MORELLO, A., KEMMERLING, U. 2010. *Trypanosoma cruzi* induces tissue disorganization and destruction of chorionic villa in an *ex vivo* infection modelo f human placenta. *Placenta*, 31(8), 705-711.
- GONZÁLEZ-HERRERA, F., CRAMER, A., PIMENTEL, P., CASTILLO, C., LIEMPI, A., KEMMERLING, U, MAYA, J. D. 2017. Simvastatin attenuates endothelial activation through 15-epi-lipoxin A4 production in murine chronic Chagas cardiomyopathy. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 61(3), e02137-16.
- HUDSON, B. I., & LIPPMAN, M. E. 2018. Targeting RAGE Signaling in Inflammatory Disease. *Annual Review of Medicine*, 69(1), 349–364.
- KIM, H. J., JEONG, M. S., & JANG, S. B. 2021. Molecular Characteristics of RAGE and Advances in Small-Molecule Inhibitors. *International journal of molecular sciences*, 22(13), 6904.

LIEMPI, A., CASTILLO, C., DUASO, J., DROGUETT, D., SANDOVAL, A., BARAHONA, K., HERNANDEZ, A., GALANTI, N., MAYA, J. D., KEMMERLING, U. 2014. *Trypanosoma cruzi* induces trophoblast differentiation: A potential local antiparasitic mechanism of the human placenta?. *Placenta*, 35(12), 1035-1042.

LONGO, D. L. & BERN, C. 2015. Chagas' Disease. *N. Engl. J. Med.* 373.

LU, B., ANTOINE, D.J., KWAN, K., LUNDBÄCK, P., WÄHÄMAA, H., SCHIERBECK, H., TRACEY, K. J. 2014. JAK/STAT1 signaling promotes HMGB1 hyperacetylation and nuclear translocation. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 111(8), 3068-3073.

MAGNA, M., PISETSKY, D. S. 2016. The alarmin properties of DNA and DNA-associated nuclear proteins. *Clinical therapeutics*, 38(5), 1029-1041.

MOLINA-BERRÍOS, A., CAMPOS-ESTRADA, C., HENRIQUEZ, N., FAÚNDEZ, M., TORRES, G., CASTILLO, C., MAYA, J. D. 2013a. Protective role of acetylsalicylic acid in experimental *Trypanosoma cruzi* infection: evidence of a 15-epi-lipoxin A4-mediated effect. *PLoS Neglected Tropical Diseases*, 7(4), e2173.

MOLINA-BERRÍOS, A., CAMPOS-ESTRADA, C., LAPIER, M., DUASO, J., KEMMERLING, U., GALANTI, N., MAYA, J. D. 2013b. Protection of vascular endothelium by aspirin in a murine model of chronic Chagas' disease. *Parasitology research*, 112(7), 2731-2739.

MOLINA, I., SALVADOR, F., & SÁNCHEZ-MONTALVÁ, A. 2016. Actualización en enfermedad de Chagas. *Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica*, 34(2), 132–138.

MONTALVO-OCOTOXTLE, I.G.; ROJAS-VELASCO,G.; RODRÍGUEZ-MORALES,O.; ARCE-FONSECA,M.; BAEZA-HERRERA, L.A.; ARZATE-RAMÍREZ,A.; MELÉNDEZ-RAMÍREZ,G.; MANZUR-SANDOVAL,D.; LARA-ROMERO,M.L.; REYES-ORTEGA,A. 2022. Chagas Heart Disease: Beyond a Single Complication, from Asymptomatic Disease to Heart Failure. *J. Clin. Med.* 2022, 11, 7262.

MORILLO, C. A., MARIN-NETO, J. A., AVEZUM, A., SOSA-ESTANI, S., RASSI JR, A., ROSAS, F., YUSUF, S. 2015. Randomized trial of benznidazole for chronic Chagas' cardiomyopathy. *New England Journal of Medicine*, 373(14), 1295-1306.

MOSQUERA, JESÚS A. 2010. Papel del receptor para compuestos de glicosilación avanzada (RAGE) en la inflamación. *Investigación Clínica*, 51(2), 257-268.

MURCIA, L., CARRILERO, B., SAURA, D., IBORRA, M., SEGOVIA, M. 2013. Diagnóstico y tratamiento de la enfermedad de Chagas. *Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica*. 31. 26–34.

NATIONAL RESEARCH COUNCIL. 2011. *Guía para el cuidado y uso de animales de laboratorio*. 8 Edición. Ediciones UC.

NUNES, J., ANDRIEUX, P., brochet, P., RIBEIRO, R., KITANO, E., KENJI, A., KEI, L., ANDRADE-SILVA, D., GOUDENÈGE, D., DEYSIRÉE, K., DE SOUSA, R., LEVY, D., PAULO, S., GALLARDO, F., TORRES, M., ALCIDES, E., MANO, M., HONORATO, R., BACAL, F., POMERANTZEFF, P., RAFAEL, F., CAMILO, P., NAKAYA, H., KALIL, J., PROCACCIO, V., CHEVILLARD, C., CUNHA-NETO, E. 2021. Co-Exposure of Cardiomyocytes to IFN- γ and TNF- α Induces Mitochondrial Dysfunction and Nitro-Oxidative Stress: Implications for the Pathogenesis of Chronic Chagas Disease Cardiomyopathy. *Frontiers in Immunology*, 12.

PEIXOTO, G. DE L., MARTINELLI FILHO, M., SIQUEIRA, S. F. DE, NISHIOKA, S. A. D., PEDROSA, A. A. A., TEIXEIRA, R. A., RAMIRES, J. A. F. 2018. Predictors of death in chronic Chagas cardiomyopathy patients with pacemaker. *International Journal of Cardiology*, 250, 260–265.

PRADEU, T. & COOPER, E. L. 2012. The danger theory: 20 years later. *Front. Immunol.* 3.
MAGNA, M. et al. 2016. The Alarmin Properties of DNA and DNA-associated Nuclear Proteins. *Clin. Ther.* 38.

RASSI, A., RASSI, A., & MARIN-NETO, J. A. 2010. Chagas disease. *The Lancet*, 375(9723), 1388–1402.

RASSI, A., RASSI, A., & MARCONDES DE REZENDE, J. 2012. American Trypanosomiasis (Chagas Disease). *Infectious Disease Clinics of North America*, 26(2), 275–291.

REQUENA-MÉNDEZ, A., ALDASORO, E., DE LAZZARI, E., SICURI, E., BROWN, M., MOORE, D. A. J., GASCON, J., & MUÑOZ, J. 2015. Prevalence of Chagas Disease in Latin-American Migrants Living in Europe: A Systematic Review and Meta-analysis. *PLoS Neglected Tropical Diseases*, 9(2), 1–16.

SALAS, C., TAPIA, R., CIUDAD, K., ORELLANA, M., KEMMERLING, U., FERREIRA, J., MAYA, J. D, MORELLO, A. 2008. *Trypanosoma cruzi*: Activities of lapachol and a- and b-lapachone derivatives against epimastigote and trypomastigote forms. *Bioorganic & medicinal chemistry*, 16, 668–674.

SANGIULIANO, B., PÉREZ, N. M., MOREIRA, D. F., & BELIZÁRIO, J. E. 2014. Cell death-associated molecular-pattern molecules: inflammatory signaling and control. *Mediators of inflammation*, 2014.

SHIM, C. Y. 2011. *RAGE and cardiovascular disease*. *Frontiers in Bioscience*, 16(1), 486.

SINGH, H.; AGRAWAL, D.K. 2022. Therapeutic Potential of Targeting the HMGB1/RAGE Axis in Inflammatory Diseases. *Molecules*, 27, 7311.

SINGH H, AGRAWAL, DK. 2022. Therapeutic potential of targeting the receptor for advanced glycation end products (RAGE) by small molecule inhibitors. *Drug Dev Res.* 2022 Sep;83(6):1257-1269.

WHO. 2015. Chagas disease in Latin America: an epidemiological update based on 2010 estimates. *Weekly Epidemiological Record / Health Section of the Secretariat of the League of Nations*, 90(6), 33–43.

YANAI, H., BAN, T., & TANIGUCHI, T. 2012. High-mobility group box family of proteins: ligand and sensor for innate immunity. *Trends in immunology*, 33(12), 633-640.

ZINGALES, B.; MILES, M.; CAMPBELL, D.; TIBAYRENC, M.; MACEDO, A.; TEIXEIRA, M.; SCHIJMAN, A.; LLEWELLYN, M.; SILVA, E.; MACHADO, C.; ANDRADE, S.; STURM, N. 2012. The revised *Trypanosoma cruzi* subspecific nomenclature: Rationale, epidemiological relevance and research applications. *Infect. Genet. Evol.* pp. 240-253.

ZINGALES, B. 2018. *Trypanosoma cruzi* genetic diversity: Something new for something known about Chagas disease manifestations, serodiagnosis and drug sensitivity. *Acta Tropica*, 184, 38–52.

ZOELEN, M. A. D., VAN. 2011. RAGE during infectious diseases. *Frontiers in Bioscience*, S3(1).

ANEXO 1



Santiago, a 29 de marzo de 2018

Certificado n°: **18121-MED-UCH**

CERTIFICADO

El Comité Institucional de Cuidado y Uso de Animales (CICUA) de la Universidad de Chile, certifica que en el protocolo número **0999-MED-UCH** del Proyecto de Investigación titulado **“Cardiopatía chagásica crónica: Evaluación preclínica del rol de la alarmina HMGB1 como blanco terapéutico”**, del Investigador **Dr. Christian Castillo Rivas** y cuyo Patrocinador-Responsable es el **Dr. Juan Diego Maya Arango**, del Programa de Farmacología Molecular y Clínica, ICBM, Facultad de Medicina, Universidad de Chile, no se plantean acciones en sus procedimientos que contravengan las normas de Bioética de manejo y cuidado de animales, así mismo la metodología experimental planteada satisface lo estipulado en el Programa Institucional de Cuidado y Uso de Animales de la Universidad de Chile.

Los investigadores se han comprometido a mantener los procedimientos experimentales planteados en el Protocolo de trabajo y a no realizar modificación alguna sin previa notificación y posterior aprobación por parte de este Comité.

Se otorga la presente certificación para el uso de 61 ratones *Mus musculus* de la cepa BALB/C, provenientes del Bioterio del Programa de Farmacología Molecular y Clínica (CBA-BIO 019), Facultad de Medicina de la Universidad de Chile, durante 48 meses a partir de esta fecha, tiempo estimado de ejecución del estudio, el cual será financiado por **Fondecyt Post-doctorado 3180452**.

El CICUA de la Universidad de Chile, forma parte de la Vicerrectoría de Investigación y Desarrollo, y está constituido por 43 miembros: 5 médicos veterinarios, 39 académicos (12 de ellos médicos veterinarios), y 9 miembros no asociados a la academia o investigación, y que cuentan con experiencia en bioética relacionada a mantención y uso de animales. El certificado que emite el Comité procede de la aprobación del “Protocolo de Manejo y Cuidado de Animales” después de un estudio acucioso y de la acogida de los investigadores de las observaciones exigidas por el Comité.

Dr. Cristian Ugaz Ruiz

Director
CICUA - VID
Universidad de Chile



Dr. Emilio Herrera Videla

Presidente
CICUA - VID
Universidad de Chile

Comité Institucional de Cuidado y Uso de Animales (CICUA)
Vicerrectoría de Investigación y Desarrollo (VID) – Universidad de Chile
www.uchile/cicua.cl email: coordinador.cicua@uchile.cl



CERTIFICACIÓN

Este Comité certifica que las modificaciones solicitadas por el **Dr. Christian Castillo** al Protocolo **MED-UCH 18121** (CBA 0999 FMUCH) han sido aprobadas, las cuales consisten en :

- Solicitar la extensión de la validez del protocolo hasta Mayo de 2022.
- Solicitar la incorporación al listado de personas autorizadas para el manejo de los animales a Daniela Paz Osses Silva , rut, 18.440.458-3, egresada de Medicina Veterinaria de la Universidad de Chile, quien realizara funciones de ayudante en esta etapa final del experimento, procesamiento de las muestras.

Estas modificaciones no alteran ni contravienen las normas Bioéticas básicas de Manejo y Cuidados de los animales a utilizar en los procedimientos experimentales previamente aprobados (Protocolo MED-UCH 18121).



Dr. Leandro Carreño
Presidente

Comité de Bioética sobre Investigación en Animales



Santiago, 9 de marzo de 2022

Comité de Bioética sobre Investigación en Animales
Facultad de Medicina - Universidad de Chile
Avda. Independencia 1027, Independencia 8380453, Santiago, Chile
Fono: 2 978 6923, Email: cba@med.uchile.cl

ANEXO 2



Unidad de Prevención de Riesgos & Bioseguridad

Santiago, 30 de Enero 2018.-

Señores

Fondecyt Posdoctorado 2018

PRESENTE

Estimados señores:

La Unidad de Prevención de Riesgos & Bioseguridad, Facultad de Medicina, Universidad de Chile certifica que ha recibido del investigador responsable Dr. Christian Raúl Castillo Rivas, para su estudio el proyecto titulado **“Cardiopatía chagásica crónica: Evaluación preclínica del rol de la alarmina HMGB1 como blanco terapéutico”** : Laboratorio de Bioquímica, Metabolismo y Resistencia a Fármacos del Programa de Farmacología Molecular y Clínica, Instituto de Ciencias Biomédicas , Facultad de Medicina, Universidad de Chile, el cual cumple con los requerimientos básicos de Bioseguridad para ser desarrollado, además se adecua a las exigencias establecidas por los manuales: CONICYT “ Bioseguridad 1ra edición,1994” y “ Manual de Normas de Bioseguridad, 2da edición 2008, Centro de Control y Prevención de Enfermedades, CDC, 4º edición, Manual Bioseguridad en laboratorios , Organización Mundial de la Salud OMS, Ginebra 2005, por tal motivo nuestra Unidad da el visto bueno para su realización.

El investigador responsable Dr. Christian Raúl Castillo Rivas, se compromete a cumplir con las normas de bioseguridad indicadas en los manuales antes mencionados y las establecidas en el Reglamento Interno del funcionamiento de los laboratorios, Unidad de Prevención de Riesgos y Bioseguridad, Facultad de Medicina, Universidad de Chile. En concomitancia se hace responsable de que todos los participantes del proyecto cumplan con las normas de bioseguridad establecidas.


Tomé conocimiento: **Dr. Christian Raúl Castillo Rivas**


Doctor Rómulo Fuentes Flores
Director de Investigación y Tecnología



c.c.

- Decano, Dr. Manuel Kukuljan
- Investigador responsable, Dr. Christian Raúl Castillo Rivas
- Archivo