

**ASOCIACIÓN DE POLIMORFISMOS DE GENES DE INMUNIDAD INNATA Y
ENFERMEDAD DE CHAGAS EN SANTANDER**

LIBETH YAJAIRA CRIADO GUERRERO

**UNIVERSIDAD INDUSTRIAL DE SANTANDER
FACULTAD DE SALUD
DEPARTAMENTO DE CIENCIAS BÁSICAS
BUCARAMANGA
2010**

**ASOCIACIÓN DE POLIMORFISMOS DE GENES DE INMUNIDAD INNATA Y
ENFERMEDAD DE CHAGAS EN SANTANDER**

LIBETH YAJAIRA CRIADO GUERRERO

**TRABAJO DE GRADO PRESENTADO PARA OPTAR AL TÍTULO DE
MAESTRA EN CIENCIAS BASICAS BIOMEDICAS**

DIRIGIDO POR:

CLARA ISABEL GONZALEZ RUGELES, *MSC., PHD.*

**UNIVERSIDAD INDUSTRIAL DE SANTANDER
FACULTAD DE SALUD
DEPARTAMENTO DE CIENCIAS BÁSICAS
BUCARAMANGA**

2010

DEDICATORIA

A Dios y a mi familia, a quienes amo profundamente. A German mi esposo y David mi hijo, quienes durante todo este tiempo aguardaron con amor por minutos de tiempo disponibles entre la maestría y mi trabajo, a ellos por su comprensión, alegría e inmensa paciencia. A mi madrecita a quien debo todo cuanto soy y a mi padre por su apoyo y su amor; a mi abuelita Bertha por ser tan adorable y especial conmigo, por sus oraciones para que este proyecto culminara satisfactoriamente.

Libeth Yajaira

AGRADECIMIENTOS

A mi querida directora de tesis Dra. Clara Isabel González quien, con su dedicación, conocimiento y calidad humana, me permitió cumplir con tan importante sueño. Le agradezco enormemente su buen ejemplo y entrega en este proceso, el cual me permitió aprender sobre el método científico, Biología Molecular e Inmunología, pero sobre todo le agradezco por enseñarme en cada actividad del laboratorio, su modo impecable de trabajar, por contagiarme de su pasión por la investigación y amor por lo que se hace día a día.

A Carmen Cecilia, a quien considero como mi mejor amiga y hermana, por estar siempre dispuesta a ayudarme y escucharme cuando la he necesitado. Le he dado muchas veces gracias a Dios por la existencia de CC y le pido para que le devuelva en bendiciones para ella y toda su familia, todo el bien que me ha hecho.

A mis compañeros de laboratorio especialmente a Martha Lucía, mi querida compañera, con la que compartí alegrías y preocupaciones en clase o en el laboratorio, a quien valoro y aprecio por su alto sentido de responsabilidad y por su buen corazón, a ella también le agradezco por estudiar conmigo sacrificando importantes horas de su familia. A German Zafra le doy las gracias por sus aportes durante la fase experimental, pues compartió sin celo sus conocimientos y experiencias, es un profesional de grandes valores académicos, intelectuales y personales. A Oscar Flórez le agradezco porque en los momentos de mayor dificultad mientras escribía la tesis, me hizo importantes aportes, fue muy valioso conocerlo, sus explicaciones me ayudaron a comprender que algunos conceptos no son tan complejos como yo pensaba. Le auguro un excelente futuro, pues es una de las personas más inteligentes y proyectadas que he conocido. A Mayra, Dora y Luisa gracias por su calidez y juventud fueron al igual que las demás personas del grupo anteriormente nombradas, muy especiales y cercanas a mis

sentimientos. A Elvira le doy las gracias por su cariño y su colaboración desinteresada.

Al Dr. Fernando Rondón por sus aportes y enseñanzas para la realización de los cálculos relacionados con genética de poblaciones.

A los directivos de la Universidad de Santander- UDES por permitirme realizar esta maestría, gracias a su apoyo y confianza pude contar con el tiempo para realizar este importante proyecto. También agradezco a mis compañeras de trabajo especialmente a Luz Mery Mendez, mi amiga, la cual siempre estuvo atenta a colaborarme.

A mis estudiantes a quienes quiero y respeto, por los que en parte tomé la decisión de matricularme en la maestría, sabía que esta maravillosa experiencia redundaría en nuevos conocimientos para compartir y aplicar con ellos.

CONTENIDO

	Pag.
INTRODUCCIÓN	19
1. LA ENFERMEDAD DE CHAGAS	21
1.1. EL AGENTE ETIOLÓGICO DE LA ENFERMEDAD DE CHAGAS	21
1.1.1. Ciclo biológico de <i>Trypanosoma cruzi</i>	23
1.2. EL VECTOR DE <i>Trypanosoma cruzi</i>	24
1.3. EPIDEMIOLOGÍA DE LA ENFERMEDAD DE CHAGAS	26
1.4. ASPECTOS CLÍNICOS DE LA ENFERMEDAD DE CHAGAS	29
1.4.1. Fase aguda	30
1.4.2. Fase crónica	31
1.5. EL DIAGNÓSTICO DE LABORATORIO DE LA ENFERMEDAD DE CHAGAS	
33	
2. INTERACCIÓN DE <i>Trypanosoma cruzi</i> CON EL HOSPEDERO HUMANO	35
2.1. ASPECTOS INMUNOLÓGICOS.....	35
3. ASPECTOS GENÉTICOS Y BIOQUÍMICOS.....	44
3.1. TNF- α	47
3.1.1. Estructura proteica del TNF- α	47
3.1.2. Función	48
3.1.3. Estructura del gen <i>Tnfa</i>	49
3.1.4. Polimorfismos del gen <i>Tnfa</i>	50
3.2. TNFRII	51
3.2.1. Estructura bioquímica	51
3.2.2. Función del TNFRII.....	51
3.2.3. Estructura del gen <i>TNFRII</i>	52
3.2.4. Polimorfismos del gen <i>TNFRII</i>	53

3.3. RECEPTORES TIPO TOLL	53
3.3.1. Estructura.....	54
3.3.2. Función de los Tlrs.....	55
3.3.3. Estudios de asociación que involucran los genes de Tlrs.....	56
3.4. TLR9	57
3.4.1. Estructura bioquímica del Tlr9	57
3.4.2. Función	57
3.4.3. Estructura del gen <i>TLR9</i>	58
3.4.4. Polimorfismos y asociación con patologías.....	59
4. JUSTIFICACIÓN.....	61
5. OBJETIVOS.....	63
5.1. OBJETIVO GENERAL	63
5.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	63
6. HIPÓTESIS DE TRABAJO	64
7. MATERIALES Y MÉTODOS.....	65
7.1. POBLACIÓN DE ESTUDIO	65
7.2. MUESTRAS CLÍNICAS.....	66
7.3. EXTRACCIÓN DEL ADN	66
7.4. SELECCIÓN DE LOS POLIMORFISMOS	67
7.5. GENOTIPIFICACIÓN DE LOS POLIMORFISMOS	67
7.5.1. Polimorfismo -308 G/A del gen <i>Tnfa</i>	67
7.5.2. Polimorfismo -1031 T/C del gen <i>Tnfa</i>	68
7.5.3. Polimorfismo + 196 T/G del gen <i>Tnfrii</i>	69
7.5.4. Polimorfismo -1237 T/C del gen <i>Tlr9</i>	69
7.6. ANÁLISIS ESTADÍSTICO	70
7.7. CONSIDERACIONES ÉTICAS	71

8. RESULTADOS.....	73
8.1. ANÁLISIS DE LA POBLACIÓN.....	73
8.1.1. Variables del estudio.....	73
8.1.1.1. Variables demográficas.....	73
8.1.1.2. Variables serológicas:	74
8.1.1.3. Variables clínicas:	74
8.1.1.4. Variables genéticas:.....	74
8.1.2. Estructura poblacional.....	75
8.1.3. Equilibrio de Hardy-Weinberg	76
8.2. POLIMORFISMOS DE LOS GENES <i>TNFA</i> , <i>TNFR11</i> Y <i>TLR9</i>	76
8.2.1. Polimorfismo -308 del gen <i>Tnfa</i>	76
8.2.2. Polimorfismo -1031 del gen <i>Tnfa</i>	78
8.2.3. Polimorfismo +196 del gen <i>TNFR11</i>	80
8.2.4. Polimorfismo -1237 del gen <i>TLR9</i>	81
9. DISCUSIÓN	83
10. CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES	91
BIBLIOGRAFIA	93
ANEXOS	119

LISTA DE TABLAS

pág..

Tabla 1. Criterios de clasificación de la enfermedad de Chagas	33
Tabla 2. Polimorfismos genéticos estudiados en el hospedero en la enfermedad de Chagas.	46
Tabla 3. Características demográficas de la población en estudio.	73
Tabla 4. Población del estudio clasificados según la gravedad de la cardiomiopatía chagásica.....	74
Tabla 5. Análisis Molecular de Varianza (AMOVA) a partir de las frecuencias alélicas de tres sistemas SNPs analizados en pacientes chagásicos.....	75
Tabla 6. Valores de P para el equilibrio de Hardy-Weinberg de las frecuencias alélicas poblacionales de los SNPs estudiados.	76
Tabla 7. Frecuencias genotípicas y alélicas del polimorfismo -308 del gen <i>TNFA</i> en individuos asintomáticos y con cardiomiopatía chagásica.	78
Tabla 8. Frecuencias genotípicas y alélicas del polimorfismo -1031 del gen <i>TNFA</i> en individuos asintomáticos y con cardiomiopatía chagásica.	79
Tabla 9. Análisis de haplotipos de los polimorfismos -308 y -1031 del gen <i>TNFA</i> de pacientes asintomáticos y sintomáticos de la enfermedad de Chagas.	80
Tabla 10. Análisis de frecuencias genotípicas y alélicas del polimorfismo -1237 del gen <i>TLR9</i>	82

LISTA DE FIGURAS

pág.

Figura 1. Estadios Del <i>Trypanosoma Cruzi</i>	22
Figura 2. Ciclo biológico.....	24
Figura 3. <i>Rhodnius prolixus</i> y <i>Triatoma dimidiata</i>	25
Figura 4. Población global infectada por <i>Trypanosoma cruzi</i>	27
Figura 5 Mapa de riesgo de transmisión de enfermedad de Chagas.....	28
Figura 6. Mapa de Santander. Incidencia de Chagas por provincias.....	29
Figura 7. Progresión clínica de la enfermedad de Chagas.	30
Figura 8. Activación de los TLRs.	37
Figura 9. Vía de señalización de los TLRs.....	39
Figura 10. Citoquinas y poblaciones celulares involucradas en la generación de respuesta de protección o patología en la enfermedad de Chagas.	41
Figura 11. Procesamiento del TNF- α y esquema de sus receptores	48
Figura 12. Mapa del gen <i>TNFA</i>	49
Fugura 13. Estructura del gen <i>TNFR1</i>	53
Figura 14 .Estructura de los <i>TLRs</i>	55
Figura 15. Mapa del gen <i>TLR9</i> en el cromosoma 3p21.3.	59
Figura 16. Electroforesis en geles de agarosa al 1% de la PCR-rflp para el polimorfismo -308 del gen <i>TNFA</i>	76
Figura 17. Electroforesis en geles de agarosa al 1% de la PCR-RFLP para el polimorfismo -1031 del gen <i>TNFA</i>	78
Figura 18. Electroforesis en geles de agarosa al 1% de la PCR-RFLP para el polimorfismo -1031 del gen <i>TNFA</i>	80
Figura 19. Electroforesis en geles de agarosa al 1% de la PCR-RFLP para el polimorfismo -1031 del gen <i>TNFA</i>	81

LISTA DE ANEXOS

	pág.
Anexo A. Declaratoria de consentimiento informado	119
Anexo B. Condiciones de PCR:	122
Anexo C. Estructura Poblacional	124

GLOSARIO

Alelo: cada una de las variantes presentadas por cada gen en un individuo, que ocupa el mismo lugar en el cromosoma.

Antígeno. Molécula que reacciona con un anticuerpo formado previamente en los receptores específicos de las células T y B.

ADN: es el ácido dextrorribonucleico

AP1: proteína Activadora 1, actúa como un factor de transcripción en la expresión génica.

ARNm: es el ácido ribonucleico del tipo mensajero, el cual lleva la secuencia de nucleótidos transcritos del ADN hasta los ribosomas, para posteriormente traducirlos a proteína.

Asociación genética. Término utilizado para describir la situación en que determinados genotipos pueden estar asociados con otros fenómenos, como determinadas enfermedades.

B7-1 (CD81) y B7-2 (CD86). Moléculas presentes en las células presentadoras de antígeno, que unen el CD28 en las células T, actuando como señales coestimuladoras.

CD14: glicoproteína de superficie, de 56 kDa, interactúa con moléculas del sistema inmune, genera procesos de activación intracelular.

CMH: el Complejo Mayor de Histocompatibilidad, es un locus genético polimórfico, ubicados en el brazo corto del cromosoma 6, determina la expresión de antígenos de Histocompatibilidad, involucrados en el procesamiento y presentación

antigénica (HLA Clase I y II), además posee otros genes como el TNF, factores de complemento, linfoquinas y proteínas de shock térmico.

CTLA-4 (CD152). Una molécula que transmite señales de regulación en las células T, compitiendo con CD28 por la unión con B7 en las células presentadoras de antígeno.

Deleción: se refiere a la pérdida de un nucleótido, lo que ocasiona una mutación a nivel del ADN.

Desequilibrio de ligamiento. Proceso por el cual dos genes se encuentran asociados en un mismo individuo con una frecuencia mayor de la predicha por el producto de sus frecuencias individuales en la población.

Exones: son las regiones codificadoras del ADN, transcritas a RNAm y posteriormente traducidas a proteínas.

Haplotipo: combinación particular de sitios o loci, en una región específica de un cromosoma.

Intrones: regiones no transcritas del ADN, son excluidas durante el proceso de transcripción de ADN a ARNm por un proceso denominado "Splicing"

Locus: lugar que ocupa un gen dentro del genoma.

Receptor: proteína de membrana celular que reconoce específicamente a determinadas moléculas.

RESUMEN

TÍTULO: Asociación de polimorfismos de genes de inmunidad innata y enfermedad de Chagas en Santander.*

AUTORES: CRIADO GUERRERO, Libeth Yajaira; GONZÁLEZ RUGELES, Clara Isabel.

PALABRAS CLAVES: TNF- α , TNFR_{II}, TLR9, polimorfismos, SNPs, Enfermedad Chagas.**

DESCRIPCIÓN

La enfermedad de Chagas constituye un problema de salud pública en Centro y Suramérica. En Colombia cerca del 5% de la población que vive en área endémica está infectada y en un estudio de bancos de sangre en Santander la seropositividad es del 6,3% (Moncayo, 2009); sin embargo zonas de alta endemia como las provincias Guanentina y Comunera reportan porcentajes de seropositividad superiores al 40% (Gutiérrez, 2004). El hecho de que entre 10 a 30% de individuos infectados desarrollen la CC, evidencia el papel del componente genético en la susceptibilidad. En este contexto, la susceptibilidad podría asociarse con polimorfismos de nucleótido simple, especialmente aquellos que afectan niveles de expresión de proteínas o su función.

Objetivo: determinar la influencia de variantes génicas funcionales presentes en los genes de inmunidad innata *TNFA*, *TNFR_{II}* y *TLR9* en la susceptibilidad a desarrollar cardiomiopatía chagásica.

Materiales y métodos: estudio de casos y controles con 313 individuos seropositivos a antígenos de *T. cruzi*, de zonas endémicas de Santander, con condiciones socioeconómicas similares y clasificados clínica y cardiológicamente como sintomáticos (casos) y asintomáticos (controles).

Resultados y discusión: el alelo A del marcador -308 (A/G) del gen *TNFA* se asoció con susceptibilidad a desarrollar cardiomiopatía chagásica, por mayor frecuencia en los pacientes sintomáticos comparado con los asintomáticos, siendo esta diferencia estadísticamente significativa. El alelo T y el genotipo TT del polimorfismo -1031(C/T) del gen *TNFA* fueron más frecuentes en los asintomáticos sugiriendo un papel de protección. Estas diferencias fueron estadísticamente significativas. El polimorfismo -196 (C/T) del gen *TNFR_{II}* del receptor de TNF- α no se detectó en la población estudiada siendo un marcador monomórfico. Tanto las frecuencias alélicas como las genotípicas del polimorfismo -1237 del gen *TLR9* no mostraron diferencias estadísticamente significativas, sugiriendo que este polimorfismo no está implicado en la susceptibilidad a desarrollar cardiomiopatía chagásica.

* Trabajo de grado

** Facultad De Salud. Escuela de Medicina, Programa en Maestría en Ciencias Básicas Biomédicas
Directora de Tesis Clara Isabel González Rugeles

ABSTRACTS

TITLE: Association of polymorphism of genes of innate immunity and Chagas disease in Santander^{*}.

AUTHORS: CRIADO GUERRERO, Libeth Yajaira; GONZÁLEZ RUGELES, Clara Isabel.

KEYWORDS: TNF- α , TNFRII, TLR9, polymorphism, SNPs, Chagas Disease.^{**}

DESCRIPTION

Chagas disease (CHD) is a public health problem in Central and South America. In Colombia about 5% of the population living in endemic areas are infected and a study of blood banks in Santander the seropositivity is 6.3% (Moncayo, 2009), for other hand in highly endemic areas such as provinces and Comunera Guanentina have been reported seropositivity rates of over 40% (Gutierrez , 2004). The fact that between 10-30% of infected individuals develop the CC, shows the role of genetic component in susceptibility, In this context, susceptibility could be associated with single nucleotide polymorphisms, especially those that affect levels of protein expression or function

Objective: To determine the influence of functional genetic variants present in innate immunity genes as TNFA TNFRII and TLR9 in the susceptibility to Chagas cardiomyopathy.

Results and discussion: The -308 marker allele (A / G) of the TNFA gene was associated with susceptibility to Chagas cardiomyopathy, this ideas was support by the high frequency of the marker – 308(A/G) in patients with CHD compared with the asymptomatic group, this difference was statistically significant. The T allele and TT genotype of polymorphism -1031 (C / T) of the TNFA gene were more frequent in asymptomatic suggesting a protective role. These differences were statistically significant. The polymorphism -196 (C / T) TNFRII receptor gene TNF- α was not detected in the population studied to be a monomorphic marker. Both the genotypic and allelic frequencies of the -1237 polymorphism of TLR9 gene were statistically significant, suggesting that this polymorphism is not involved in the susceptibility to Chagas cardiomyopath.

^{*} Msc tesis

^{**} Health Faculty, Medicina School. Biomedics Basic Sciences Master Program.

Thesis Director Clara Isabel González Rugeles

INTRODUCCIÓN

La enfermedad de Chagas (EC) es causada por la infección con el parásito protozoario intracelular *Trypanosoma cruzi*. Afecta aproximadamente 8 millones de personas en América Latina (WHO, 2008) y alrededor de 1 millón de personas en Colombia (Moncayo *et al*, 2008); En la región nororiental se ha encontrado una prevalencia de infección superior al 40% lo que la convierte en una zona activa de transmisión (Gutierrez *et al.*, 2004). La EC presenta manifestaciones clínicas, que van desde la forma asintomática indeterminada hasta las formas crónicas cardíacas y/o digestivas, las cuales se caracterizan por procesos inflamatorios crónicos acompañados de fibrosis que se presentan sólo entre el 10 al 30% de los casos.

En Colombia, la falla cardíaca debida a la cardiomiopatía chagásica es la manifestación clínica de la enfermedad más frecuentemente encontrada (Guhl, 1999). La evidencia histopatológica sugiere que el infiltrado inflamatorio, así como también los mediadores inflamatorios, son factores determinantes en el desarrollo y la progresión de la cardiomiopatía chagásica (Cunha-Neto *et al*, 2009), Sin embargo, a pesar de ser aceptado el papel crucial del sistema inmune en la patogénesis de la enfermedad, aún se continúa en la búsqueda de parámetros inmunológicos que pudieran ser determinantes en la presentación de la forma clínica de la patología en los individuos infectados. Es por ello que los polimorfismos génicos que afecten los niveles de expresión de proteínas inmunomoduladoras, especialmente citoquinas y quimioquinas podrían predisponer a los individuos infectados a un fenotipo inflamatorio y como consecuencia influenciar el desarrollo de la cardiomiopatía chagásica crónica (Dutra *et al*, 2009). En este sentido el Grupo de Inmunología y Epidemiología

Molecular (GIEM), ha desarrollado una línea de investigación en la búsqueda de estos marcadores genéticos de asociación y ha descrito polimorfismos asociados con riesgo en los genes *IL1B* (Flórez *et al*, 2006), *IL12* (Zafra *et al*, 2007), *MIF* (Torres *et al*, 2009), *TGFB* (Calzada *et al*, 2009) e *IFNG* (Torres *et al*. 2010). Otros grupos han reportado asociaciones con los genes *CCR5* (Calzada *et al*, 2002), *MCP1*, *BAT1* y *NFKB* (Ramazawmy *et al*, 2006, 2007, 2008).

El objetivo de este estudio fue determinar la influencia de variantes génicas funcionales presentes en los genes de inmunidad innata *TLR9*, *TNFA* y *TNFRII* en la susceptibilidad a desarrollar cardiomiopatía chagásica, en grupos de pacientes seropositivos frente a antígenos de *T. cruzi*, sintomáticos y asintomáticos, provenientes de zonas endémicas de Santander (Colombia).

1. LA ENFERMEDAD DE CHAGAS

La enfermedad de Chagas (EC) es una compleja zoonosis producida por la infección con el parásito protozoario *Trypanosoma cruzi* y transmitida principalmente por insectos vectores (Triatominos), de la familia *Reduviidae*, perteneciente a la subfamilia *Triatominae*.

Recibió su nombre en honor al médico brasileño Carlos Chagas, quien fue el primero en describir la enfermedad en el año de 1909. La EC es endémica en Sur y Centro América, encontrándose distribuída desde el sur de Argentina hasta el sur de los Estados Unidos de América (WHO, 2009). Sin embargo, debido a las migraciones humanas, actualmente se han presentado casos en países de Norte América, Europa, Asia y Oceanía (Franco-Paredes, 2009).

1.1. EL AGENTE ETIOLÓGICO DE LA ENFERMEDAD DE CHAGAS

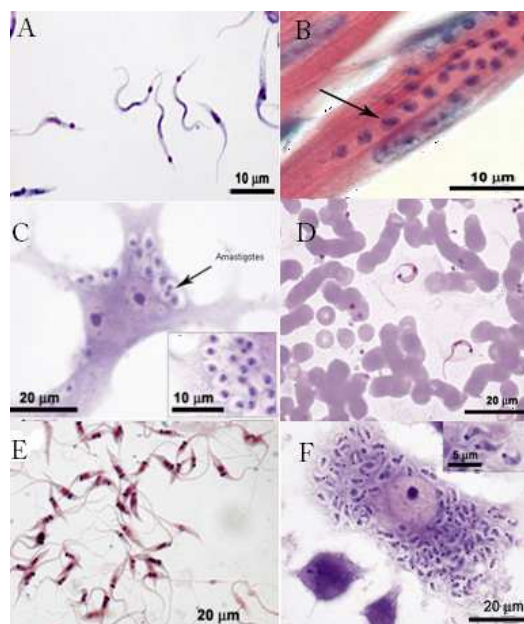
El parásito *Trypanosoma cruzi* es un protozoario flagelado perteneciente a la clase *Mastigophora*, orden *Kinetoplastida*, familia *Trypanosomatidae*, género *Trypanosoma*; del grupo *Stercoraria*. Recibió su nombre en honor a Oswaldo Cruz, quien fue el mentor de Carlos Chagas

Durante su ciclo de vida, *T. cruzi* presenta cuatro formas morfológicas y biológicamente diferentes:

- a. Tripomastigote metacíclico: estadio no replicativo, caracterizado por poseer una forma elongada y flagelada. Esta forma se desarrolla en la porción posterior del intestino y el recto del insecto vector e inicia la infección en una amplia variedad de hospederos vertebrados. (Figura 1A).

- b. Amastigote: estadio replicativo, se caracteriza por su forma redondeada y aflagelada, se localiza en el citoplasma de las células del hospedero mamífero en donde se replica por fisión binaria. (Figura 1B y 1C).
- c. Tripomastigote sanguíneo: después de 9 fisiones binarias los amastigotes se convierten en tripomastigotes flagelados que estallan la célula hospedera liberándose a la circulación sanguínea, donde invaden a otras células y así diseminan la infección en el hospedero. El ciclo se cierra cuando el individuo infectado es picado por el triatmino (Figura 1D).
- d. Epimastigote: forma replicativa y móvil localizada en el intestino medio del insecto vector de donde migra al intestino posterior diferenciándose a la forma no replicativa infectante (tripomastigote metacíclico). El estadio epimastigote es la forma predominante en los cultivos axénicos (Figura 1E y 1F).

Figura 1. Estadios Del *Trypanosoma Cruzi*



Tomado de www.fiocruz.br/chagas_esp/cgi/cgilua.exe/sys/start.htm?sid=13. (A) Tripomastigotes metacíclicos. (B) Amastigotes intracelulares. (C) Músculo cardíaco de ratón con formas amastigotes (flecha). (D) Tripomastigotes

sanguíneos. (E) Epimastigotes. (F). Célula infectada con formas tripomastigotes e intermediarias.

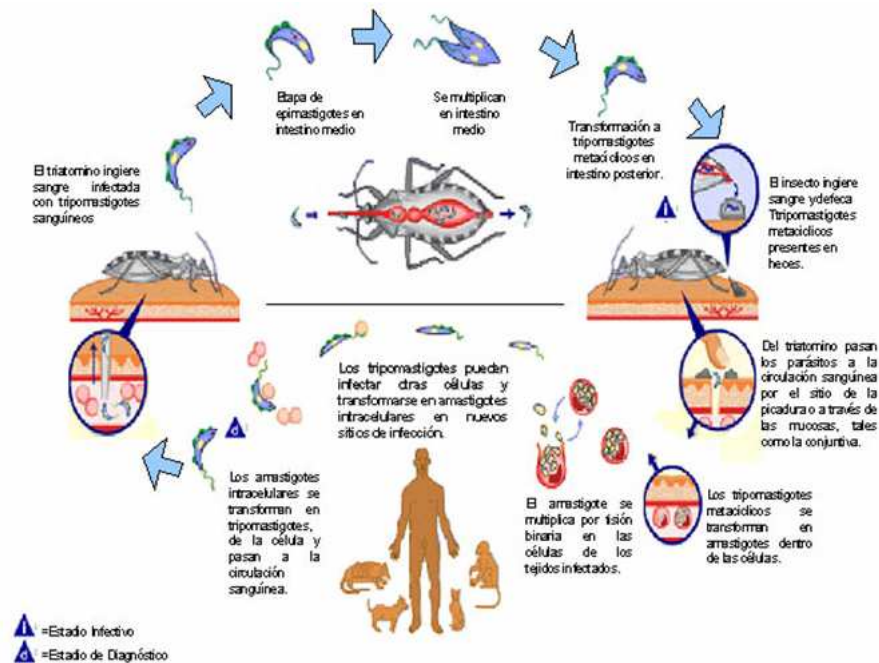
1.1.1. Ciclo biológico de *Trypanosoma cruzi*

T. cruzi posee un ciclo de vida complejo que involucra dos hospederos, uno invertebrado, principalmente un insecto vector y algunos vertebrados, entre los que se encuentra el hombre (Agüero *et al.*, 2006). Durante la alimentación del insecto vector, los tripomastigotes sanguíneos que se encuentran en la sangre del hospedero vertebrado infectado son ingeridos y posteriormente se diferencian a epimastigotes. Cuando la infección se establece en el intestino anterior (estómago) del insecto vector, los epimastigotes se dividen repetidamente por fisión binaria y pueden adherirse a las membranas perimicrovillares de las células intestinales. Los epimastigotes se conectan a la cutícula rectal y se diferencian a tripomastigotes metacíclicos, tanto los epimastigotes como los tripomastigotes pueden ser eliminados a través de las heces y la orina del insecto vector (García *et al.*, 1999).

En el hospedero vertebrado las formas eliminadas por el insecto vector entran en contacto con mucosas o regiones de la piel con lesiones. Los tripomastigotes metacíclicos son altamente infectantes e invaden los primeros tipos celulares que encuentran en el tejido, como los macrófagos, fibroblastos o células epiteliales.

Una vez instaurada la invasión ocurre la proliferación intracelular y la liberación de tripomastigotes, así como también de algunas formas intermediarias y amastigotes en el espacio intercelular. Estas formas pueden invadir nuevas células localizadas en el sitio de la infección, alcanzar la corriente circulatoria o cualquier tejido del hospedero (De Souza, 2002), (Figura 2).

Figura 2. Ciclo biológico



Tomado

de

<http://www.facmed.unam.mx/deptos/salud/periodico/chagas/img/dos.jpg>

1.2. EL VECTOR DE *Trypanosoma cruzi*

Es un insecto del filo Arthropoda, en la clase Insecta, del orden *Hemiptera*, de la familia *Reduviidae*, perteneciente a la subfamilia *Triatominae*. Se han descrito aproximadamente unas 130 especies silvestres y domiciliarias de Triatominos (Schofield, 2000).

Las especies domiciliarias colonizan principalmente viviendas rurales o áreas urbanas y periurbanas y son responsables de la mayoría de los casos de Chagas humano en áreas endémicas. Las especies silvestres son habitantes estrictas de

ecótopos silvestres como grietas de piedras, nidos de aves o escondrijos de mamíferos y cuevas, entre otros.

Las especies *Rhodnius prolixus*, *Triatoma dimidiata* y *Triatoma infestans* están bien adaptadas a la vivienda humana y son los principales vectores de la Enfermedad de Chagas en Latinoamérica (Bejarano *et al.*, 1987; Guhl, 2005). En Santander, los vectores más frecuentemente encontrados son *Rhodnius prolixus*, *Triatoma dimidiata* y *Panstrongylus geniculatus* (Sandoval *et al.*, 2000; Guhl, 1999) (Figura 3).

Figura 3. *Rhodnius prolixus* y *Triatoma dimidiata*



Tomado de OPS, Guía para muestreo en actividades de vigilancia y control vectorial de la enfermedad de Chagas, 2003.

R. prolixus principal vector de *T. cruzi* en el país ha sido blanco de las campañas de control químico mediante la aspersión de insecticidas piretroides y organofosforados; aunque a las poblaciones extradomiciliarias de *T. dimidiata* se les debe dar especial atención, teniendo en cuenta que se pueden convertir en fuente de reinfestaciones, con domiciliación completa o no, debido a su capacidad para ocupar diferentes hábitats, aumentando el riesgo para la transmisión del

parásito a humanos. En este sentido algunos estudios sugieren que puede ser debido a la menor susceptibilidad al piretroide usado (Angulo *et al.*, 1997, 1999, 2005; Guhl & Vallejo, 1999).

La infestación domiciliar de *T. dimidiata* se distribuye en Santander en 21 municipios, en áreas rurales, encontrándose en municipios como San Joaquín y Onzaga en viviendas en buen estado infestadas con el vector con altas tasas de infección por *T. cruzi*. (Angulo *et al.*, 1997, 2005a).

1.3. EPIDEMIOLOGÍA DE LA ENFERMEDAD DE CHAGAS

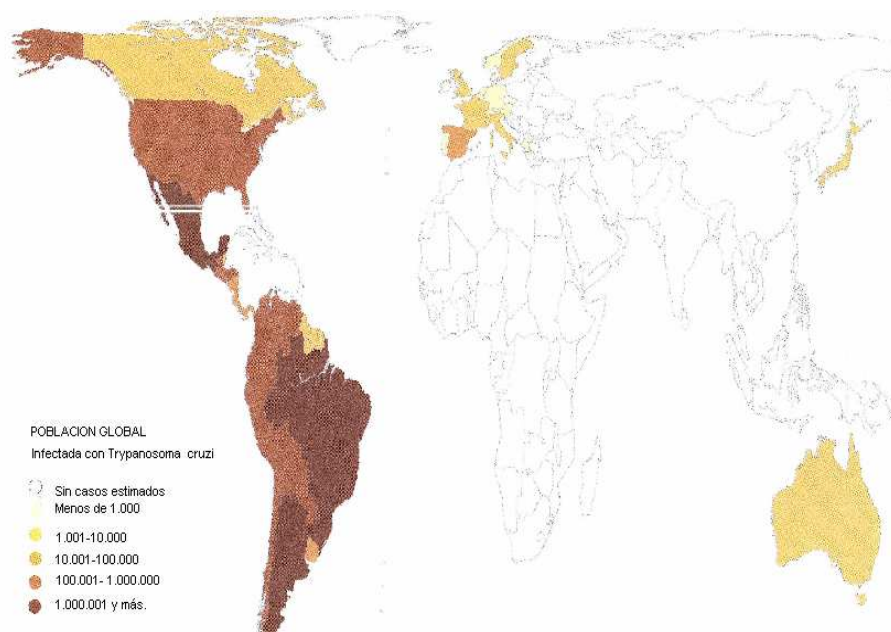
En los últimos años la incidencia de la infección por *T. cruzi* ha tenido una notoria disminución cercana al 70%, gracias a los programas coordinados de erradicación de los vectores adelantados en países del cono sur, como Uruguay, Chile, Argentina y Brasil (Moncayo, 2009). Sin embargo, la EC aún continúa siendo un problema de salud pública en Centro y Suramérica. Se estima que aproximadamente entre 15 a 16 millones de personas están infectadas con *Trypanosoma cruzi*, de estas cerca de un 15 - 30% evolucionan hacia la cardiomiopatía chagásica y aproximadamente un 10% de los cardíopatas evolucionan a la forma dilatada (Dutra *et al.*, 2009).

La cardiomiopatía chagásica crónica presenta una alta mortalidad, calculada en cerca de 50.000 personas por año (OMS, 2009), lo cual incrementa los costos en el sistema de salud. Además, se calcula que cerca de 75 a 90 millones de individuos están en riesgo de adquirir la infección en Latinoamérica (Coura *et al.*, 2009), (Figura 4).

La enfermedad se encuentra distribuida en México, Nicaragua, Honduras, Guatemala, El Salvador, Costa Rica, Panamá, Colombia, República Bolivariana de

Venezuela, Guyana francesa, Surinam, Belice, Brasil, Ecuador, Perú, Bolivia, Uruguay, Paraguay, Argentina y Chile. Debido a los fenómenos migratorios desde países endémicos, se ha incrementado el número de casos en Europa y Norte América, representando un riesgo adicional para la transmisión de la enfermedad a través de la transfusión sanguínea y el transplante de órganos (Franco-Paredes *et al.*, 2009).

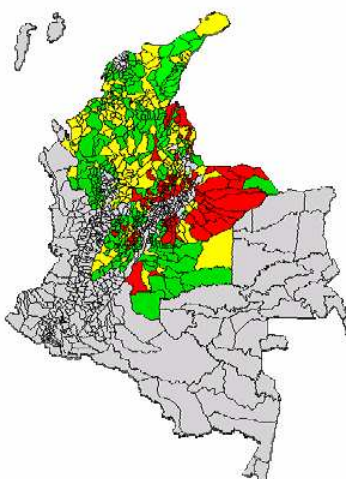
Figura 4. Población global infectada por *Trypanosoma cruzi*.



Tomado de www.chagas-rompe-el-silencio.com. 2009

Se estima que en Colombia hay cerca de 8.000.000 de personas que están expuestas a la transmisión vectorial (Figura 5); además, aproximadamente el 5% de la población que vive en zonas endémicas está infectada lo que equivale a cerca de 700.000 personas en todo el país (Moncayo *et al.*, 2009).

Figura 5 Mapa de riesgo de transmisión de enfermedad de Chagas.

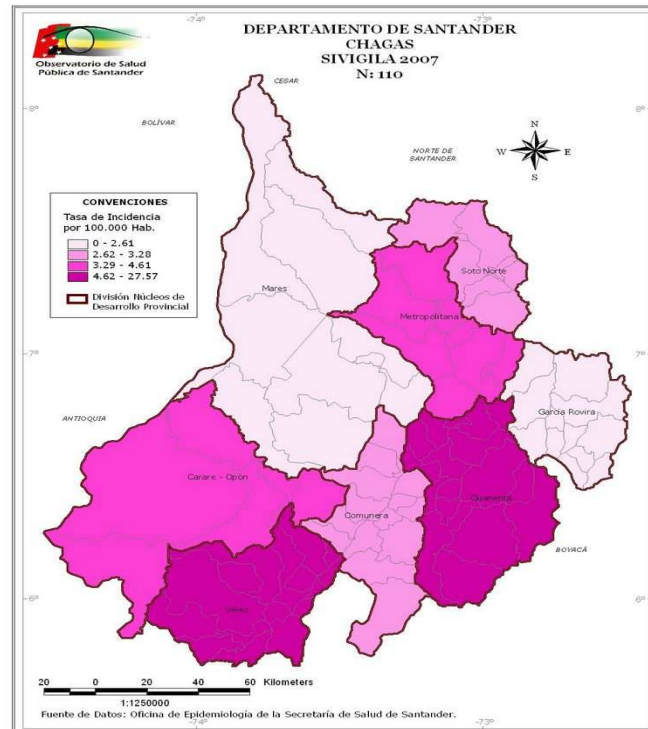


Tomado de Guhl *et al.*, 2005.

El índice de seroprevalencia y factores de riesgo de la enfermedad de Chagas, para el año 2005 fue de 35 por cada 1.000 niños menores de 15 años, principalmente en la región oriental del país incluyendo a Santander (Guhl, 2005). Los departamentos con las mayores tasas de infección son Arauca (21,1%), Casanare (10%), Santander (6,3%), Norte de Santander (5,2%), Boyacá (3,7%), Cundinamarca (1,9%) y Meta (1,7%) (Moncayo *et al.*, 2009).

En estudios realizados en Santander se han reportado porcentajes de seropositividad superiores al 40% en algunos municipios de las provincias Comunera y Guanentina (Gutierrez *et al.*, 2004). (Figura 6). Sin embargo, con la implementación de programas de mejoramiento de viviendas a través de la asignación de fondos a los municipios de alto riesgo epidemiológico, se han beneficiado más de 1500 viviendas, controlando al menos en parte, la transmisión vectorial.

Figura 6. Mapa de Santander. Incidencia de Chagas por provincias.

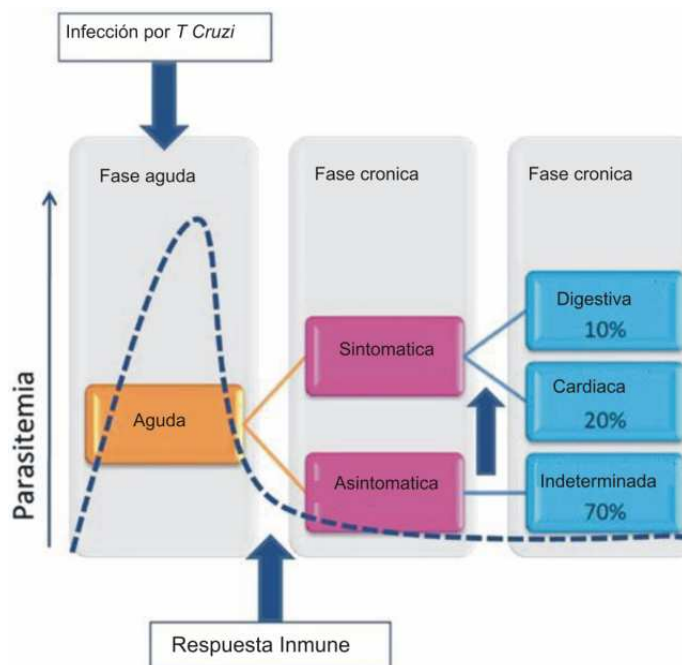


Tomado de SIVIGILA, 2007.

1.4. ASPECTOS CLÍNICOS DE LA ENFERMEDAD DE CHAGAS

La EC cursa principalmente con dos fases, una fase aguda y una fase crónica (Figura 7).

Figura 7. Progresión clínica de la enfermedad de Chagas.



Tomado y modificado de Dutra *et al.*, 2009.

1.4.1. Fase aguda

Se presenta inmediatamente después de la infección con *Trypanosoma cruzi*, con un tiempo de duración que oscila entre 2 y 4 meses. Esta fase suele ser asintomática, y cursa con altos niveles de parasitismo en sangre y tejidos (Sosa-Estani & Segura, 2006).

La detección de la infección en la fase aguda es uno de los desafíos en el diagnóstico de la enfermedad, debido a que los individuos a menudo no muestran síntomas y si estos son evidentes, usualmente son inespecíficos. El 95% de los casos presentan fiebre, cefalea, astenia, mialgia, artralgia, anorexia, linfadenopatía, hepatoesplenomegalia leve y miocarditis. Cuando el sitio de inoculación es la mucosa conjuntival, el paciente puede desarrollar edema

periorbital unilateral (signo de Romaña), conjuntivitis y linfadenitis preauricular con la aparición en el sitio de inoculación de un nódulo cutáneo local (Chagoma), el cual se presenta en más del 50% de los casos. La mayoría de los casos agudos se resuelven y sólo hasta el 5% presentan complicaciones fatales debido a miocarditis y/o meningoencefalitis (Coura *et al.*, 2007). De los casos agudos detectados y tratados el 75% pueden ser curados; en el evento que la enfermedad no sea curada o detectada tempranamente, los pacientes pueden progresar a la fase crónica de la enfermedad (Dutra *et al.*, 2009).

1.4.2. Fase crónica

La transición desde la fase aguda a la crónica está acompañada por una marcada disminución en la parasitemia, como resultado de la respuesta inmune del hospedero, la mayoría de los pacientes en fase crónica son asintomáticos y se clasifican como indeterminados (Rassi *et al.*, 2007). Este periodo inicia entre 8 y 10 semanas después de la fase aguda y puede persistir durante varios años o indefinidamente. Se caracteriza por la ausencia de síntomas clínicos y electrocardiogramas normales. No obstante las pruebas serológicas continúan siendo positivas y la parasitemia, aunque no sea detectable por métodos parasitológicos directos, puede ser detectada por xenodiagnóstico entre un 20 a 60% de los casos, éstos pueden constituirse en un importante reservorio de la infección (Guhl *et al.*, 1999). Aproximadamente entre 15 y 30 años después de haber contraído la infección, los individuos que presentan la forma indeterminada desarrollan patologías asociadas a tejido cardíaco y/o digestivo y en casos severos conduce a la muerte (Ferreira *et al.*, 2003).

La cardiomiopatía chagásica crónica (CCC) es considerada la forma clínica mas importante de la EC y generalmente aparece entre la segunda y cuarta década de vida, lo cual equivale a un periodo entre 5 y 50 años después de la infección. Las manifestaciones clínicas dependen del grado de daño miocárdico, de la presencia

de arritmias y del tipo de insuficiencia cardíaca (Rocha *et al*, 2007) (Tabla 1). Los síntomas más frecuentes son palpitaciones, mareos, disnea de esfuerzo y fatigabilidad.

En las formas digestivas crónicas de la enfermedad de Chagas las manifestaciones clínicas resultan de la disperistalsis del esófago y/o colon, causadas por la destrucción del plexo mientérico, lo que genera alteraciones en los patrones de secreción, motilidad y absorción de nutrientes; cuando la disperistalsis y el espasmo se acompañan de agrandamiento del esófago y/o del colon conducen a megaesófago y/o megacolon (Coura, 2007).

En la forma neurológica de la EC se han observado alteraciones de los sistemas nerviosos simpático y parasimpático. Tanto en estudios histológicos como fisiológicos se han presentado alteraciones del sistema nervioso autónomo. Además, en esta fase han sido reportadas: la alteración de los ganglios de la raíz dorsal, una pérdida generalizada de los axones sensoriales y dolor precordial (Guhl, 1999).

Tabla 1. Criterios de clasificación de la enfermedad de Chagas

Criterios de clasificación para evaluar la gravedad de la infección chagásica	
Grado I	Infección chagásica sin compromiso clínico, radiológico ni electrocardiográfico de lesión cardíaca.
Grado II	Infección chagásica con sintomatología de moderada a nula, radiología normal o indicativa de hipertrofia cardíaca leve o con alteraciones electrocardiográficas como: extrasístoles, bloqueo aurículo-ventricular incompleto, bloqueo completo o incompleto de la rama derecha del haz de His, bloqueo completo o incompleto de la rama izquierda del haz de His, alteraciones primarias de repolarización.
Grado III	Infección chagásica con sintomatología evidente, hipertrofia cardíaca moderada y alteraciones electrocardiográficas como: bloqueo completo de la rama derecha del haz de His con desvío del eje eléctrico medio QRS para la izquierda (hemibloqueo anterior izquierdo), zonas eléctricamente inactivas, bloqueo, aurículo-ventricular completo, fibrilación o "flutter" auricular
Grado IV	Infección chagásica con sintomatología pronunciada con insuficiencia cardíaca. Estudio radiológico que muestre cardiomegalia extrema o electrocardiograma con alteraciones graves o múltiples (arritmias complejas y graves zonas eléctricamente inactivas).

Tomado de OPS-OMS. Tratamiento etiológico de la enfermedad de Chagas. Conclusiones de una consulta técnica. OPS/hcp/hct/140/99.

1.5. EL DIAGNÓSTICO DE LABORATORIO DE LA ENFERMEDAD DE CHAGAS

Depende de la fase de la enfermedad. Si se sospecha en la fase aguda, deben preferirse las pruebas parasitológicas, dado que el parásito es detectable fácilmente. Cuando se trata de confirmar o excluir un individuo con sospecha de fase crónica, las pruebas de elección son las serológicas, que son más rápidas, económicas y reproducibles.

Cuando se trata de la confirmación parasitológica por serología dudosa, o la investigación del efecto tripanocida de una nueva droga, se realizan exámenes parasitológicos de multiplicación, a partir de muestras con escasos parásitos, éstos promueven su reproducción (hemocultivo o xenodiagnóstico) o la amplificación de ácidos nucleicos (DNA o RNA) con sondas apropiadas como la reacción en cadena de la polimerasa, PCR (del inglés Polymerase Chain Reaction), (Guhl *et al.*, 2005).

2. INTERACCIÓN DE *Trypanosoma cruzi* CON EL HOSPEDERO HUMANO

2.1. ASPECTOS INMUNOLÓGICOS

Frente a un reto producido por una sustancia o un organismo extraño, se requiere una respuesta mediada por la acción coordinada tanto de los mecanismos de la respuesta inmune innata como de la respuesta inmune adquirida (Strieter *et al.*, 2002). Recientemente, se ha demostrado que en el hospedero infectado con *Trypanosoma cruzi*, la inmunidad innata es de gran relevancia, porque no solamente actúa como primera línea de defensa contra el patógeno, mediante la acción de células fagocíticas y algunas moléculas solubles, iniciando distintos tipos de respuesta inflamatoria, activación de células presentadoras de antígeno y de otras células como las asesinas naturales o NK (del inglés, *Natural Killer*), sino que actúa como inmunomoduladora de la respuesta inmune específica, a través de la activación de distintas poblaciones celulares que llevan a su vez a la producción y secreción de grupos específicos de quimioquinas, citoquinas proinflamatorias, antiinflamatorias y receptores de estas.

Importantes estudios han identificado algunas moléculas del parásito que son capaces de estimular componentes celulares del hospedero, implicados en la respuesta inmune innata. En *Trypanosoma cruzi*, recientemente se han identificado y estudiado moléculas de superficie implicadas en el inicio de la infección, entre ellas el glicofosfatidil-inositol o GPI anclado (del inglés glycophosphatidyl inositol), glicoproteínas unidas al GPI como la mucina y la transialidasa, proteína Tol A del flagelo (Quanquin *et al.*, 1999) y la proteína de superficie ASP-2 de 83KDa (Villata *et al.*, 1998). Estos antígenos de *T. cruzi* son conocidos como patrones moleculares asociados a patógenos o PAMPs (del inglés Pathogen-associated molecular pattern). También se han descrito productos liberados por el patógeno, tales como la proteína Tc52 y la cruzipaina las cuales

son reconocidas por diversos autores como factores de virulencia y supervivencia del parásito (Allaoui *et al.*, 1999). Del mismo modo el ADN rico en CpG derivado de *T. cruzi* es reconocido por las células del hospedero y puede llegar a activar a los macrófagos a través de receptores como el TLR9 (Bafica *et al.*, 2006). Por lo tanto, algunas de estas moléculas actúan como ligandos para receptores de superficie de células propias de la respuesta inmune innata del hospedero entre ellas los macrófagos y las células dendríticas (Koga *et al.*, 2006).

Diversos estudios han evidenciado que el macrófago cumple un papel importante en la fase temprana de la infección por microorganismos intracelulares (Noel *et al.*, 2004). Estas células participan en la generación de una respuesta inmune pro-inflamatoria a través de la activación de receptores de reconocimiento de patrones de patógenos (PRRs). Entre los diversos PRRs, los receptores de tipo Toll o TLRs (del inglés Toll like receptors) son los más estudiados. Estos receptores reconocen moléculas esenciales de los más diversos microorganismos, los cuales actuando en conjunto reconocen la mayoría de los patógenos; además se ha demostrado que estos receptores participan en el reconocimiento de moléculas propias de *T. cruzi* (Gazinelli *et al.*, 2006; Tarleton, 2007; Savino *et al.*, 2007).

El reconocimiento del GPI anclado del parásito por parte del TLR2 ubicado en la superficie de las células hospederas desencadena la producción de citoquinas como interleuquina 12 (IL-12) y factor de necrosis tumoral (Gazzinelli *et al.*, 2001) (Figura 8). Nuevos datos demuestran que la proteína Tc52 de *T. cruzi* induce la activación de las células dendríticas a través de TLR2 (Quassi *et al.*, 2002). Así mismo, el complejo TLR4-MD2 reconoce moléculas de GPI libres, conocidas como GIPL ceramida (del inglés Glycoinositolphospholipids containig ceramide) (Gazzinelli *et al.*, 2006).

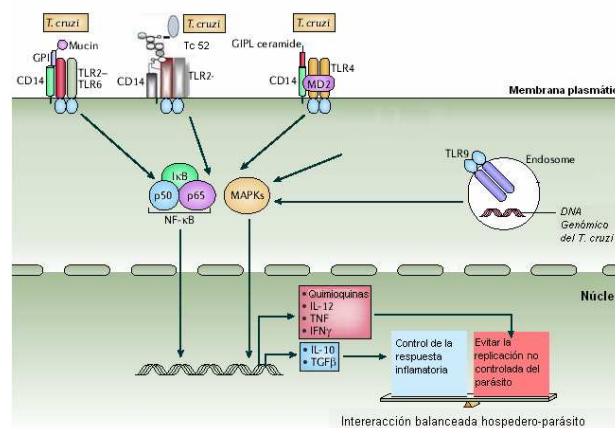
Recientemente se demostró que el ADN rico en CpG de diferentes parásitos incluyendo el *T. cruzi* estimula la producción de óxido nítrico (ON), IL-12 y TNF- α a

través del TLR9 (Bafica *et al.*, 2006), estos hallazgos fueron comprobados más tarde al utilizar ratones deficientes de TLR2^{-/-} y TLR9^{-/-}, los cuales fueron altamente susceptibles a la infección por *T. cruzi* (Tarleton, 2007).

También se ha reportado que un complejo trimolecular conformado por TLR2, TLR6 y CD14 está involucrado en el reconocimiento de estas moléculas, tal como se observó en un experimento realizado en macrófagos deficientes de TLR6^{-/-}, los cuales se activaron en presencia de anclaje de GPI de *T. cruzi* (Oliveira *et al.*, 2004).

Finalmente, podemos concluir que *T. cruzi* posee moléculas antigénicas que son reconocidas por diversas moléculas de inmunidad innata como TLR2, TLR4, TLR6 y TLR9.

Figura 8. Activación de los TLRs.



Tomado y modificado de Gazinelli *et al.*, 2006.

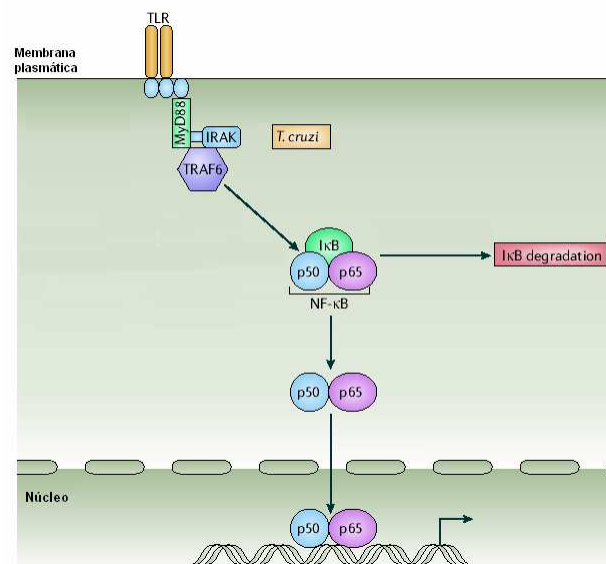
La unión de los TLRs con los PAMPs con excepción de TLR3, induce la producción de citoquinas de manera dependiente del factor nuclear κB (NF- κB) a

través de una vía de señalamiento que involucra la molécula adaptadora MyD88 (del inglés Molecule myeloid differentiation primary - response gene 88) (Figura 9).

Esta molécula posee un dominio TIR y un dominio de muerte, el dominio TIR permite la unión de MyD88 a la molécula TLR a través de una interacción homotípica TIR-TIR de ambas moléculas. Entre tanto, el dominio intermedio (DI) de la molécula Myd88 interacciona con IRAK-4 (del inglés kinasa serine treonina) y con IRAK-1 mediante su dominio de muerte (DD); la proximidad de estas dos cinasas inducen a IRAK-4 para que fosforile a IRAK-1 (del inglés interleukin-1 receptor- associated kinase 1), luego IRAK-1 fosforilado permite la conducción de la señal activadora a otras moléculas miembros de la familia TRAF (del inglés TNF-receptor associated factor) como TRAF6 (del inglés TNF receptor- associated factor 6) al cual se une IRAK-1, ambos se disocian del complejo del receptor e interactúan con otro grupo protéico formado por TAK1 (del inglés TGF-B associated Kinasa) y TAB1 y 2 (del inglés TAK1 binding protein). Formado este complejo protéico surgen dos vías independientes una conduce a la activación tanto del NF- κ B como de las MAP cinasas (del inglés mitogen activated protein). En la primera vía TAK1 fosforila IKK, marcándolo para su ubiquitinación y posterior destrucción por el proteosoma. El dímero NF- κ B (p50, p65) es traslocado al núcleo, una vez la secuencia de localización nuclear queda expuesta el factor de transcripción se une a sus elementos de respuesta en los promotores de sus genes blanco (Foster *et al.*, 2009) e inician la transcripción de genes (*IL12* y *TNFA*) inmunológicamente relevantes, los que podrían afectar la replicación del parásito. Además NF- κ B activa la transcripción de genes que codifican otras proteínas de señalamiento, tales como IRF7 e IRF8 (Levy *et al.*, 2002; Taylor *et al.*, 2006). En la segunda vía la activación de TAK1 induce la fosforilación de las MAPK's (ERK, JNK y p3) promoviendo la traslocación nuclear del factor AP1. Existen moléculas estructuralmente similares a Myd88 como TIRAP, ésta es una proteína adaptadora que contiene también un dominio TIR (Horng *et al.*, 2002), y ayuda a MyD88 en la señalización cuando sólo son activados TLR2 o TLR4

(Jefferies, *et al.*, 2003). Sin embargo, TLR3 emplea una vía de señalamiento independiente de MyD88 que involucra a la molécula adaptadora TRIF (del inglés TIR- domain-containing adapter protein inducing interferon- γ), esta vía de señalamiento también puede ser usada por TLR4 y recluta el complejo protéico TRAF6-TAK1-TAB2 que activa las IKKs permitiendo la liberación de NF-KB. A través de otra vía la molécula TRIF interactúa con el dímero TBK1/IKKB e induce la translocación del factor nuclear de IRF3 (del inglés Interferon Regulatory Factor 3) (Sato *et al.*, 2003) e induce la producción de citoquinas como el interferon tipo I (IFN α y β) (Takeda *et al.*, 2003). Tanto el interferon γ como el α se unen a su receptor, fosforilan a STAT1 y STAT2 induciendo su dimerización y traslocación al núcleo, para que con la proteína p48 (complejo ISGF3), reconozcan secuencias en los promotores de los genes de respuesta antiparasitaria y estimulen su transcripción. Este interferon es responsable de la respuesta pro-inflamatoria durante la fase temprana de la infección con el parásito, pero algunos estudios muestran que también podría estar contribuyendo en la fase crónica con el desarrollo de formas más severas de la enfermedad (Gazinelli, 2004).

Figura 9. Vía de señalización de los TLRs.

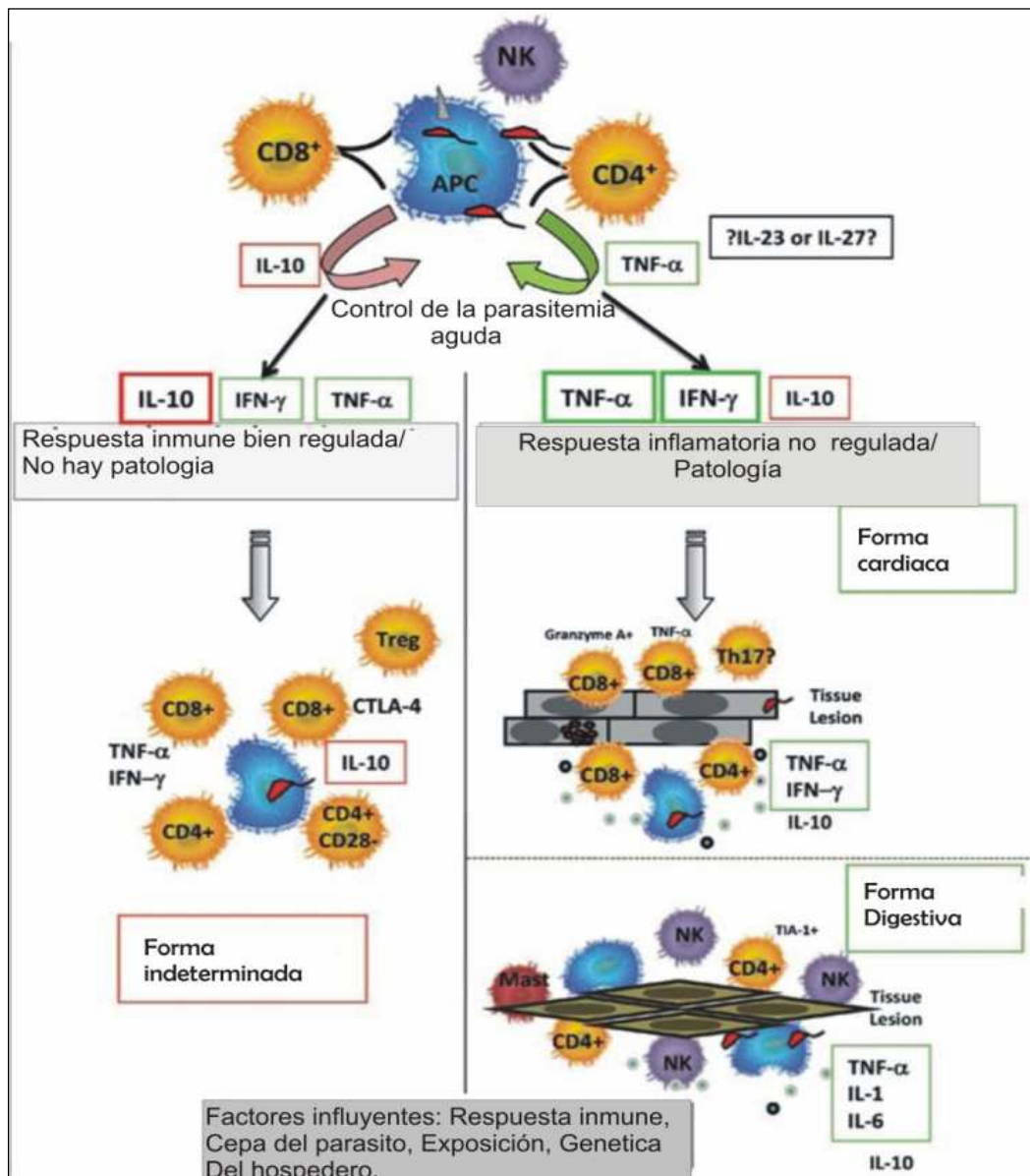


Tomado y modificado de Gazinelli *et al.*, 2006.

En EC se acepta que la inflamación crónica desempeña un papel central en la generación de lesiones en el corazón, las cuales son mediadas, al menos en parte, por citoquinas inflamatorias y quimioquinas. En este contexto TNF- α ha sido de gran interés, dada la importancia que esta citoquina tiene en procesos inflamatorios y su papel en la patogénesis de enfermedades crónicas (Correa, 2004; Goëb *et al* 2005) y algunas enfermedades infecciosas (Keane, 2001; Meddeb-Amaoui *et al.*, 2001; Karplus *et al.*, 2002; Kamali-Sarvestani *et al.*, 2006; Campino, 2009).

La interacción inicial entre el parásito y el hospedero es clave para establecer el control efectivo de la parasitemia y al mismo tiempo es crítico en la formación del microambiente de citoquinas, el cual puede regular la diferenciación subsecuente de las subpoblaciones de células T efectoras. Dependiendo del balance entre las subpoblaciones de células T activas biológicamente y su actividad funcional, la respuesta total será exitosa en mantener la forma clínica asintomática o progresar a las formas crónicas cardíacas y/o digestivas más severas. (Bilate & Cunha-Neto, 2008, Dutra *et al.*, 2009). (Figura 10).

Figura 10. Citoquinas y poblaciones celulares involucradas en la generación de respuesta de protección o patología en la enfermedad de Chagas.



Tomado y modificado de Dutra *et al.*, 2009.

Una vez los antígenos de *T. cruzi* son capturados por macrófagos y células dendríticas presentes en el infiltrado son posteriormente procesados y presentados a las células del sistema adaptativo (linfocitos T y B). Estas células

reconocen el antígeno unido a las moléculas del complejo mayor de histocompatibilidad y junto con las moléculas coestimuladoras como CD80, CD86 y CD40, inducen la activación de los linfocitos T (Th0) y la posterior diferenciación a Th1 (Souza *et al.*, 2004). Este linfocito Th1 produce INF- γ que estimula tanto a los linfocitos B para que produzcan anticuerpos efectoras, como a los linfocitos T CD8⁺ para que destruyan el patógeno (Campos *et al.*, 2004). Sin embargo algunos autores han caracterizado la población de células T de pacientes en fase indeterminada y han encontrado una alta frecuencia de células T CD4⁺ que no expresan molécula coestimuladora (CD28) (Meneses *et al.*, 2004). Estudios posteriores fueron diseñados para caracterizar mejor estas células en relación a su potencial inmuno-regulador, encontrando una correlación entre la frecuencia de células T CD4⁺ CD28⁻ y la expresión de IL-10 en pacientes en fase indeterminada. En este sentido, la IL-10 producida por los monocitos favorece la activación de linfocitos T reguladores (CD4⁺, CD25⁺) cuya finalidad es el control de la inflamación una vez haya sido eliminado el parásito, pero también podría estar favoreciendo un estado de persistencia del parásito que conduciría probablemente a los infectados a una fase asintomática o indeterminada o en algunos casos al desarrollo de una fase crónica (Vitelli *et al.*, 2006). Adicionalmente se evaluó la expresión de la molécula CTLA-4 en células T de pacientes indeterminados y se encontró una mayor expresión de CTLA-4 especialmente dentro de la población de células T CD8⁺ sugiriendo su papel regulador (Souza *et al.*, 2007).

Los pacientes con cardiomiopatía chagásica crónica presentan un marcado infiltrado inflamatorio de tipo monoclonal en el tejido cardíaco, con una relación CD4⁺/CD8⁺ de 0.75 (Fuenmayor, 2005). Las células CD8⁺ y las células CD4⁺ (CD4⁺CD28⁻) muestran características de células T activadas y se correlacionan con la expresión de citoquinas inflamatorias como TNF- α e INF- γ (Reis 1993, Gomes 2003). Estudios recientes muestran que las características de las células CD4⁺ y CD8⁺ de células T circulantes son similares en pacientes con la forma crónica e indeterminada de la enfermedad de Chagas (Menezes 2004, Dutra

2009). Estudios previos reportaron resultados similares, relacionados con la presencia de niveles séricos elevados de TNF- α aún en individuos con las formas asintomáticas (Ribeirao *et al.*, 2000; Abel *et al.*, 2001). Sin embargo, estos niveles fueron mayores en los pacientes con la forma crónica y se relacionaron con severidad, debido a que en pacientes con reducción en más del 50% de la fracción de eyección ventricular izquierda los niveles fueron mayores (Ferreira 2003). Esta evidencia sugiere que tanto las células T CD4+ y CD8+ como las citoquinas TNF- α e INF- γ están participando en la inducción de las lesiones del tejido cardiaco, así como también, en el desarrollo de la cardiomiopatía chagásica crónica en pacientes infectados con *T. cruzi* (Ferreira *et al.*, 2003; Talvani *et al.*, 2004; Dutra 2009).

Paradójicamente, utilizando el modelo de hámster los investigadores encontraron que el bloqueo de TNF- α con el receptor soluble Etanercept empeora la función cardíaca, aún en ausencia de aumento de parasitismo y toxicidad de drogas. Estos resultados sugieren que la señalización de TNF- α podría ser cardioprotectiva por prevenir la apoptosis de cardiomiocitos, como se ha visto en estudios realizados en ratones knockout de TNFR1/TNFR2 (Bilate *et al.*, 2007). Por lo tanto es importante manejar con precaución la posibilidad de utilizar el bloqueo de citoquinas en el tratamiento de la CCC (Cunha-Neto *et al.*, 2009).

En conclusión es posible que el desarrollo o no de las formas clínicas de la enfermedad de Chagas en los humanos dependen de la complejidad de la respuesta inmune generada durante la infección por *Trypanosoma cruzi* y de un fino control en la producción y regulación de los distintos tipos de citoquinas que median el proceso inflamatorio.

3. ASPECTOS GENÉTICOS Y BIOQUÍMICOS

La progresión de una infección así como el desarrollo de las diferentes formas clínicas y los diferentes grados de severidad están relacionados con la compleja relación parásito/hospedero, que también abarca factores como estado nutricional, estado inmune previo como, por ejemplo, exposición a otros patógenos, así como las características genéticas tanto del patógeno como del hospedador.

Encontrar genes candidatos asociados con una patología permite comprender los mecanismos de patogenidad de la enfermedad, convirtiéndolos en marcadores de riesgo, diagnóstico, pronóstico o en posibles blancos terapéuticos (Huizinga, 2004).

La selección de los genes candidatos puede tener una justificación posicional si asume que los genes de susceptibilidad con mayor efecto están ubicados y ligados a otros genes relacionados con la enfermedad (Delgado-Vega *et al*, 2006). La selección también puede tener una justificación funcional si asume la alteración en la función o niveles de expresión de la proteína codificada y su papel en la fisiopatología de la enfermedad, en este aspecto los polimorfismos genéticos son los más analizados (Delgado-Vega *et al*, 2006).

Los polimorfismos genéticos son variantes del genoma que aparecen por mutaciones en algunos individuos, se transmiten a la descendencia y adquieren cierta frecuencia en la población tras múltiples generaciones (Inieta *et al.*, 2005). Se considera que una variante génica es polimórfica cuando la frecuencia de uno de sus alelos en la población es superior al 1% La variabilidad fenotípica de cada individuo, puede darse de forma significativa por los polimorfismos de nucleótido simple- SNPs (del inglés single nucleotide polymorphism), y en menor grado a

inserciones, delecciones, secuencias repetidas y/o re-arreglos cromosómicos debido a que el genoma humano no es una estructura estática. Los polimorfismos son la base de la evolución y los que se consolidan, bien pueden ser silentes o proporcionar ventajas a los individuos, aunque también pueden contribuir a causar enfermedades (Benhamou, 2002).

En el Proyecto Genoma Humano y el Proyecto Internacional HapMap, se ha estimado que existen aproximadamente 10 millones de SNPs y haplotipos comunes de SNPs lo que permite mapeos genéticos más densos, de mayor poder y precisión (Delgado-Vega *et al*, 2006; The International HapMap Consortium, 2004). Adicionalmente, los SNPs se constituyen en la mejor opción para la identificación de genes asociados con enfermedades complejas (Thomas *et al.*, 2005), cuya utilidad fue confirmada mediante la tipificación de más de 11.000 SNP en 157 familias del Reino Unido, mostrando mayor contenido de información, uniformidad y definición frente a los microsatélites (John, 2004).

En EC se han adelantado estudios de asociación genética, la mayoría de genes estudiados están relacionados con la inmunopatogenicidad de la enfermedad entre ellos aquellos involucrados con funciones de reconocimiento, citoquinas, quimiotaxis, factores de crecimiento, ligandos celulares, moléculas de adhesión, señalización intracelular y factores de transcripción (Tabla 2).

Sin embargo, algunos de los estudios no han podido ser replicados y se han encontrado discrepancias entre las diferentes poblaciones; esto puede explicarse, al menos en parte, por la heterogeneidad genética de los diferentes grupos étnicos analizados y por la diferencia en la frecuencia de los polimorfismos (Delgado-Vega *et al*, 2006).

Tabla 2. Polimorfismos genéticos estudiados en el hospedero en la enfermedad de Chagas.

Gen	Polimorfismo	Susceptibilidad / Asociación	Referencia
HLA	Clase I y Clase II	Contradictoria	Deghaide, 1998 ; Fernandez –Mestre 1998 ; Colorado, 2000, Fae, 2000 ; Layrisse, 2000; Nieto, 2000; Cruz-Robles, 2004
<i>Cadena Pesada de Miosina Cardíaca B</i>	(CATT)n	Negativa	Fae, 2000
<i>CCL2/MCPI</i>	-2518	Cardiomiopatía chagásica crónica(CCC)	Ramasawmy, 2006 a
<i>CCR5</i>	+53029	CCC	Calzada, 2001 a.
<i>NRAMP1</i>	5'(GT)n, -236-- >T,D543N, 3'UTR delección	Negativa	Calzada , 2001 b
<i>NOS2</i>	(CCTTT)n	Negativa	Calzada, 2002.
<i>TNF-α</i>	-308, -238	Negativa	Beraun, 1998, Drigo, 2007
<i>TNF-α</i>	-308	CCC	Rodríguez –Perez, 2005
<i>TNF-α</i>	-308	Progresión a muerte/transplante de corazón	Drigo, 2006
<i>LTA</i>	+80,+252	CCC	Ramasawmy, 2007
<i>BAT-1</i>	-22, 348	CCC	Ramasawmy, 2006 b
<i>NFKB IL-1</i>	-62, -262	CCC	Ramasawmy, 2008
<i>IL1B</i>	-31, +3954, +5810	CCC	Flórez, 2006
<i>IL-10</i>	-1082	CCC	Costa, 2009
<i>IL-12B</i>	+1188	CCC	Zafra, 2007
<i>TLR 2</i> <i>TLR 4</i>	Arg753Gln Asp299Gly, Thr399Ile	Negativa	Zafra, 2008
<i>TLR 1</i> <i>TLR 2</i> <i>TLR 4</i> <i>TLR 5</i> <i>TLR 9</i>	+1805 +753 +896 +392 -1237, -1486	Negativa	Ramasawmy, 2009
<i>PTPN22</i>	+1858	Negativa	Robledo, 2007
<i>MIF</i>	-173	CCC	Torres, 2009.
<i>TGFB</i>	-988, -800, -509 -+ 263. +10	Negativa CCC	Torres, 2009.
<i>IL6</i>	-174	Negativa	Torres, 2009.
<i>IFNG</i>	+874	Negativa	Torres, 2009
<i>MAL/TIRAP</i>	S180L	CCC	Ramasawmy , 2009
<i>ACE</i>	I/D	Negativa	Cuoco, 2005 Pascuzzo-Lima, 2009

CCC. Cardiomiopatía Chagásica crónica.

Tomado y modificado de Cunha –Neto *et al*, 2009.

3.1. TNF- α

El TNF- α es producido principalmente por macrófagos, linfocitos T y células NK, siendo el principal mediador de la respuesta inflamatoria aguda en respuesta a la infección por diversos microorganismos (Aguillon, 2002).

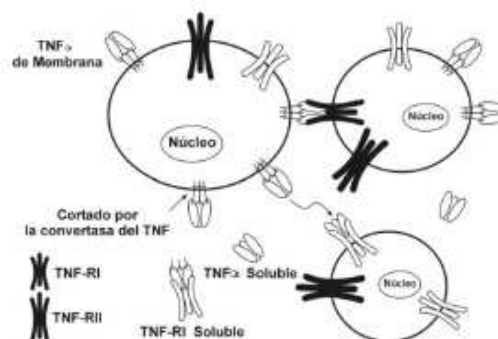
3.1.1. Estructura proteica del TNF- α

El TNF- α madura está expuesta en la superficie de la membrana celular, contiene 233 aminoácidos (aá), pesa 26 kDa, es biológicamente activa y participa en la citotoxicidad e inflamación por interacción celular (Ibelgaufits, 1995; Dinarello, 1999).

El TNF- α soluble es una proteína de 17 KDa, conformada por 157 aá, producida a partir del TNF- α de membrana, el cual es procesado por cortes a nivel del residuo 76 por acción de la enzima convertidora del TNF- α (TACE), una metaloproteína que está también en la membrana celular.

Estudios cristalográficos muestran que el TNF- α está constituido por tres monómeros asociados no covalentemente y cuyo extremo N-terminal está expuesto en la superficie (Callard, 1994). Figura 11.

Figura 11. Procesamiento del TNF- α y esquema de sus receptores



Tomado de Anaya, 2003.

3.1.2. Función

Se identificó por primera vez como mediador de la necrosis tumoral en el suero de ratones tratados con lipopolisacárido (LPS) produciendo necrosis hemorrágica y completa regresión de tumores trasplantados, también se le ha descrito en muerte de células tumorales *in vivo* (Inoco, 1987).

El TNF- α es una proteína inducible y en individuos sanos no se expresa constitutivamente; a nivel transcripcional y pos-transcripcional se controla su expresión, aumentada en respuesta a la infección y a diversos agentes inflamatorios (Kamali-Sarvestani *et al.*, 2006; Karplus *et al.*, 2002; Meddeb-Amaoui *et al.*, 2001; Campino, 2009; Harney *et al.* 2003). El TNF- α tiene una potente actividad citotóxica y actúa como mediador letal en la respuesta inmune aguda o crónica de enfermedades infecciosas e inflamatorias crónicas (Anaya, 2003).

El TNF- α es una molécula pleiotrópica promoviendo la síntesis de citoquinas como IFN- γ , IL-1, IL-2, IL-4, IL-6, IL-10, IL-12, IL-18, factor de crecimiento y transformación-beta (TGF- β), leucotrienos, proteínas de fase aguda y hormonas como el cortisol, epinefrina, glucagón, insulina y norepinefrina (Ibelgaufts, 1995). Algunos de los mediadores inducidos por el TNF- α actúan a su vez como

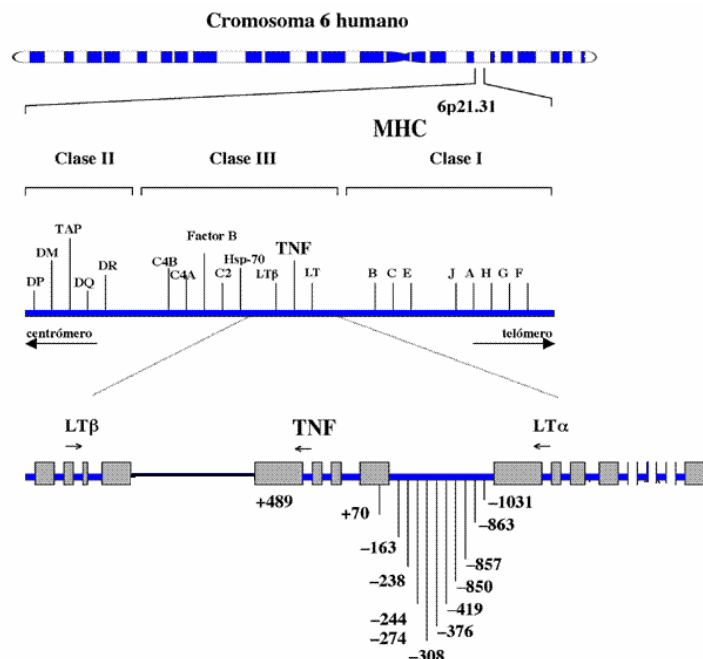
inhibidores de su expresión, como la IL-6, IL-10, el cortisol y la prostaglandina E2 (Dinarello, 1999).

3.1.3. Estructura Del Gen *Tnfa*

El gen que codifica al TNF- α se encuentra ubicado en el brazo corto del cromosoma 6 (6p21.31), dentro del Complejo Mayor de Histocompatibilidad (CMH) clase III, entre los genes HLA-B y el factor C del Complemento, y codifica una proteína de 26 kD (Ibelgaufits, 1995; Spies, 1986).

El gen *TNFA* tiene un tamaño de 3,6 Kb y lo conforman tres intrones y 4 exones; el primero codifica una proteína precursora de 233 aminoácidos, los tres restantes codifican para cada uno de los monómeros que conforman la proteína activa (Tracey, 1994).

Figura 12. Mapa del gen *TNFA*.



Tomado y modificado de <http://www.scielo.cl/fbpe/img/rmc/v130n9/F22.gif>

3.1.4. Polimorfismos del gen *Tnfa*

El gen *TNFA* es altamente polimórfico, se han identificado cinco polimorfismos microsatélite denominados TNF a, b, c, d, e (Nedospasov, 1991; Gallagher, 1997) y han sido registrados al menos 19 SNPs, 8 de ellos ubicados en la región promotora, los otros se encuentran tanto en sitios de transcripción como en regiones no transcritas (UTR). Entre los SNPs más estudiados está el de la posición +489 ubicado en el primer intrón, con dos alelos dados por las bases G/A (Van Krugten, 1999), el de la posición +70 en el extremo 5' de la región no codificante en la cual se pueden dar sustituciones de G/A, en la región promotora y el más importante corresponde al cambio de G/A en el sitio -308 que genera dos alelos conocidos como TNF1 (G) y TNF2 (A) y que afecta los niveles de expresión de la proteína (D'Alfonso, 1994; Wilson, 1993). Siendo el alelo A responsable del incremento en la transcripción del gen (Wilson *et al.*, 1997; Tang *et al.* 2000, Hajeer, 2001). Además de estos polimorfismos se encuentran otros en las posiciones -1031 T/C, -863 C/A, -857 C/A, -851 C/T, -419 G/C, -376 G/A, -308 G/A, 238 G/A, 49 G/A (Mira, 1999) (Figura 12).

Los polimorfismos localizados en la región promotora del gen se han asociado con la susceptibilidad a infecciones bacteriana y parasitarias, como malaria cerebral y leishmaniasis mucocutánea (McGuire, 1994; Cabrera, 1995), lepra (Roy 1997) y sepsis (Mira, 1999) entre otras.

Entre los polimorfismos más estudiados en la enfermedad de Chagas, se encuentran los de la posición -238 y el -308 ubicados en la región promotora (Beraun *et al.* 1998; Rodríguez-Pérez *et al.* 2005; Drigo *et al.* 2006; Drigo *et al.* 2007) con resultados contradictorios.

3.2. TNFRII

La respuesta del TNF- α depende de la unión a sus receptores (Figura 11). El TNF- α cuenta con dos receptores estructuralmente diferentes, denominados receptor tipo I (TNF-RI; p55 o p60) y el receptor tipo II (TNF-RII; p80 o p75).

El TNFRI (del inglés Tumor Necrosis Factor Receptor I) está presente en todos los tipos de células excepto en los glóbulos rojos, la distribución de este receptor es mas amplia que la del TNFRII, su expresión es constitutiva en varios tipos de células. Su función principal es interactuar con la forma soluble de 17KD del TNF- α y regular procesos proinflamatorios y apoptóticos de esta citoquina (Grel,1995; Anaya, 2003)

El TNFRII (del inglés Tumor Necrosis Factor Receptor II), se expresa predominantemente en células hematopoyéticas especialmente las de origen mieloide y no se expresa en eritrocitos. Es el principal receptor de TNF- α expresado en macrófagos, linfocitos T y B.

3.2.1. Estructura bioquímica

Los receptores son glicoproteínas transmembranales y son parte de los 21 miembros de la familia de receptores TNF caracterizados por tener múltiples regiones ricas en cisteínas, de forma preferencial a nivel de su dominio extracelular N-terminal, además de la presencia de dominios de muerte dentro de su estructura.

3.2.2. Función del TNFRII

El TNFRII es el principal receptor de TNF- α se encuentra en la superficie de las células T y es un importante mediador de la apoptosis autoregulada en las células

CD8+, además puede actuar con TNFR1 para destruir células no linfoides (Beltinger *et al*, 1996). El TNFRII soluble puede inhibir la acción de TNF- α , compitiendo con los receptores expresados en las membranas (Engelmann, 1990).

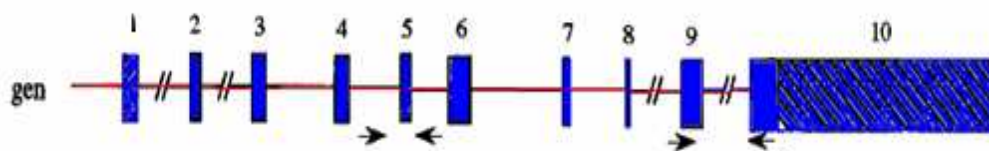
La expresión del TNF-RII se da en forma inducida y media en forma cooperativa o independiente un amplio rango de respuestas celulares como proliferación, diferenciación, citotoxicidad o apoptosis celular. Además, se han identificado formas solubles (sTNFRII) aunque responde principalmente a la forma transmembranal del TNF- α , confiriéndole un papel principal en la respuesta inflamatoria local (Anaya, 2003).

Se ha observado que el TNFRII puede ligar el TNF- α y luego pasarlo al TNF-RI para potenciar la acción del TNFRI cuando las concentraciones del TNF- α son muy bajas, por tal razón se le ha denominado al TNFRII como “paseador del ligando” (Kollias, 1999; Grell, 1998).

3.2.3. Estructura del gen *TNFRII*

El gen del TNFRII (*TNFRSF1B* o *TNFR75*), se localiza en el cromosoma 1 en la región 1p36.2 y da origen a la proteína p75; abarca cerca de 43 kb. El gen está compuesto por 10 exones (entre 34 pb a 2,5 kb) y 9 intrones (343 pb a 19 kb) (Santee y Owen-Schaub, 1996). Se han encontrado en la región promotora elementos consenso para los factores de transcripción implicados en el desarrollo y la activación de células T (Anaya, 2003) (Figura 13)

Figura 13. Estructura del gen TNFRII



3.2.4. Polimorfismos del gen *TNFRII*

Es menos polimórfico que el gen *TNFA*. La presencia de polimorfismos en los genes de los *TNFR* se han asociado con severidad y diferencia en la respuesta a la terapia en la enfermedad de Crohn, resultado de transplante (Suryaprasad y Prindiville, 2003) y con artritis reumatoidea (Ferraccioli 2003, Dieudé *et al.* 2004). Se reportó una fuerte relación de un polimorfismo en el exón 6 del *TNFRII* con respuesta a la terapia anti-TNF α , sugiriendo la necesidad de identificar los polimorfismos para dirigir el tratamiento y mejorar la respuesta (Feracolli, 2003).

De las variaciones la más estudiada es el polimorfismo +196 T/G (denominado T676G). Este polimorfismo produce un cambio del aminoácido metionina por arginina en la posición +196 de la proteína madura y esta variación se ha asociado con el desarrollo de enfermedades como artritis reumatoide y lupus eritematoso sistémico (Morita, 2001). En la enfermedad de Chagas no se han publicado hasta la fecha artículos o investigaciones sobre polimorfismos génicos de este receptor.

3.3. RECEPTORES TIPO TOLL

La familia de los receptores tipo Toll, puede diferir en número entre especies, en los mamíferos varían entre 10 y 15 TLRs (Iwasaki y Medzhitov, 2004). En los humanos se han encontrado 11 TLRs, los cuales han sido clasificados en cinco subfamilias de acuerdo a su localización en los cromosomas, estructura genómica y secuencias de aminoácidos: TLR2, TLR3, TLR4, TLR5 y TLR9. La subfamilia

TLR2 está compuesta por TLR1, TLR2, TLR6 y TLR10 y la subfamilia TLR9 por TLR7, TLR8 y TLR9. Las sub familias restantes están conformadas por un solo miembro (Sandor *et al.*, 2005).

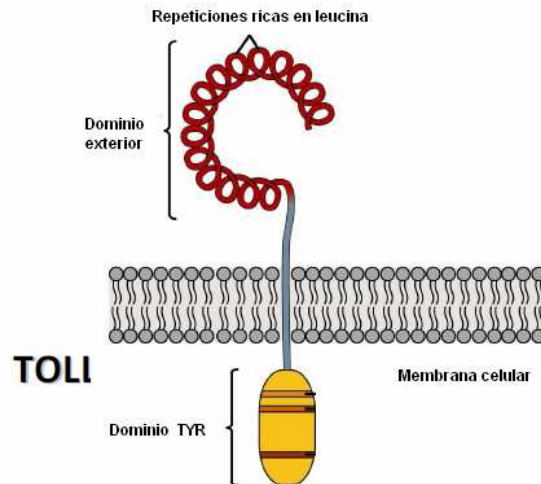
Los TLR se encuentran ampliamente distribuidos en células que sirven de puerta de entrada o están en contacto con los diferentes patógenos, tales como monocitos/macrófagos, neutrófilos, células dendríticas, células epiteliales intestinales y células endoteliales; también se han encontrado TLR-2 y TLR-4 en linfocitos B y T, pudiendo estar en algún momento relacionadas con la respuesta inmune adaptativa.

3.3.1. Estructura

Los TLRs son glicoproteínas transmembranales tipo I, que por su homología en la región citoplasmática pertenecen a la superfamilia de los receptores de interleuquina 1 (IL-1R).

En su región extracelular posee motivos con repeticiones ricas en leucina (LRR) en los cuales los IL-1R poseen tres dominios semejantes a las inmunoglobulinas, se encuentran localizados en células del sistema inmune profesionales tales como células mononucleares, dendríticas y macrófagos (Figura 14) (Takeda, 2003).

Figura 14 .Estructura de los TLRs.



Tomado y modificado de Kuby 2007. Immunology, sexta edición.

3.3.2. Función de los Tlrs.

Los TLR reconocen productos microbianos e inician una respuesta inmune compleja para eliminar los patógenos invasores.

La estimulación de los TLRs por los PAMPs, conduce a la activación de vías de señalizaciones intracelulares comunes y específicas que resultan en la translocación del factor nuclear kappa-B (NF- κ B), activación y diferenciación celular y la secreción de citoquinas y quimioquinas, las cuales participan en el reclutamiento de las células profesionales con la posterior activación de la inmunidad adaptativa.

Cada TLR puede ser activado por cierto tipo de PAMP, sin embargo, es posible la comunicación cruzada entre receptores, lo que incrementa la especificidad y amplía el patrón de PAMPs reconocidos por un mismo receptor y la respuesta generada (Martin y Frever, 2005).

3.3.3. Estudios de asociación que involucran los genes de TLRs

El papel modulador de los TLRs, tanto en inmunidad innata como adquirida ha llevado a que hayan sido estudiados en su papel en el desarrollo de varias enfermedades incluídas las infecciosas (Wurfel, 2006). Se han descrito polimorfismos de TLR2 asociados con tuberculosis (Ogus, 2004; Ben-Ali, 2004); dos polimorfismos en TLR4 se han asociado con riesgo aumentado de shock séptico (Lorenz, 2002), en infección por bacterias Gram-negativas y aumento en la susceptibilidad a la meningitis meningocócica (Hill, 1998).

En la enfermedad de Chagas también se han realizado estudios inmunogenéticos analizando los genes de los TLRs, se ha encontrado que los ratones infectados con *Trypanosoma cruzi* deficientes de TLR2 y la molécula adaptadora MyD88, tienen afectada la producción de citoquinas proinflamatorias, presentan aumento en la parasitemia y aumento de la mortalidad (Campos *et al.*, 2004). Los ratones de la cepa C3H/HeJ, los cuales son naturalmente deficientes de TLR4 después de la infección con GPI de *Trypanosoma cruzi*, presentan alta parasitemia y mayor mortalidad comparados con ratones wild type para TLR4, demostrando la importancia de TLR4 en el reclutamiento de neutrófilos (Oliveira *et al.*, 2004).

Por otra parte, se han realizado estudios que evalúan la presencia de polimorfismos en los genes de los TLRs y su posible asociación con el desarrollo de las formas crónicas de la enfermedad de Chagas. En el caso de los genes TLR2 y TLR4, no se observaron diferencias estadísticamente significativas entre el grupo de individuos asintomáticos y los pacientes con cardiopatía crónica en población colombiana (Zafra *et al.*, 2008). De igual forma, al analizar SNPs presentes en los genes de *TLR1*, *TLR2*, *TLR4*, *TLR5* y *TLR9* no se encontró asociación entre estos y el desarrollo de la fase crónica de la enfermedad en población brasilera, pero si con los individuos homocigotos para la variante S180L del gen *MAL/TIRAP* que se encontró en una proporción significativamente más

alta en individuos asintomáticos, indicando una posible disminución en el riesgo de desarrollar cardiopatía chagásica crónica al disminuir la transducción de señales cuando TLR2 y TLR4 se unen a sus respectivos ligandos (Ramasawmy *et al.*, 2009).

3.4. TLR9

El TLR9 en humanos es expresado por células dendríticas plasmacitoides y células B, (Hornung, 2002), mientras que en ratones, se encuentra en células dendríticas mieloides, macrófagos y células B (Hemmi, 2000).

3.4.1. Estructura bioquímica del Tlr9

La proteína TLR9 humana contiene 1.032 aminoácidos y comparte una identidad de aminoácidos del 75,5% con el TLR9 murino. Al igual que otras proteínas TLR, TLR9 contiene repeticiones ricas en leucina (LRRs) extracelulares y un dominio citoplasmático TIR (Toll/Interleuquina-1R). También tiene un péptido señal (residuos 1 a 25) y un dominio transmembrana (residuos 819 a 836) (Cornelie *et al.*, 2004)..

3.4.2. Función

El TLR9 reconoce especialmente ácidos nucleicos, específicamente las secuencias de ADN CpG, las cuales son cadenas hexaméricas formadas por dinucleótidos centrales CG no metilados flanqueados por dos pirimidinas en posición 5' y dos purinas en la región 3' (Brown, 2002). Estos dinucleótidos no metilados son frecuentes en el ADN de microorganismos, incluyendo bacterias y protozoarios (Hemmi *et al.*, 2000; Brown, 2002).

El ADN de las bacterias tiene efectos estimulantes en las células inmunes de los mamíferos, las cuales dependen de la presencia de dinucleótidos CpG no metilados en el ADN bacteriano. En contraste, el ADN de los mamíferos posee una baja frecuencia de dinucleótidos CpG y estos son en su mayoría metilados; por lo tanto, el ADN de mamíferos no posee actividad inmunoestimulante. Esto fue demostrado en ratones deficientes del gen *TLR9* (Hemmi *et al.* 2000).

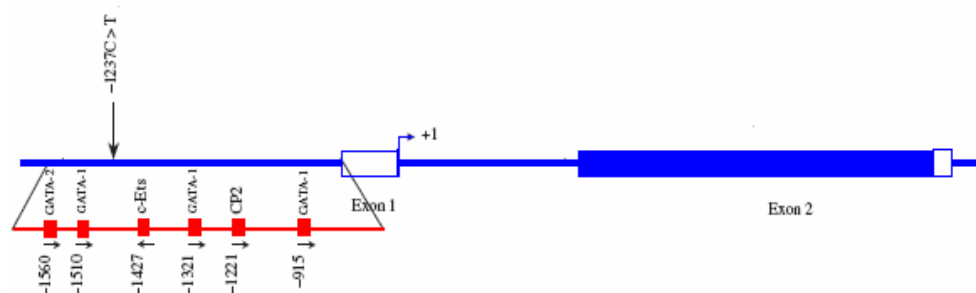
Después de la unión del motivo CpG en el compartimento endosómico donde se localiza el TLR9, son activadas las cascadas de señalización que involucran al NF- κ B y quinasas activadas por mitógenos, permitiendo la liberación de niveles altos de IFN- α . Algunos estudios han sugerido que al activarse TLR9 actúa como un mediador entre la inmunidad innata, dirigiendo la respuesta secundaria hacia Th1 (Latz, 2004). Por otra parte en ratones knockout, el TLR9 ha sido reportado como el responsable de la maduración de las células dendríticas y la producción de citoquinas proinflamatorias, las cuales incluyen TNF, IL-6 e IL-12 producidas por macrófagos (Hemmi, 2000; Ahmad-Nejad, 2002).

3.4.3. ESTRUCTURA DEL GEN *TLR9*

El gen se expresa principalmente en órganos como el bazo, ganglios, médula ósea y leucocitos. El análisis por northern blot en tejidos de ratón, reveló que la expresión más alta de *TLR9* es en el bazo (Hemmi *et al.* 2000).

El gen *TLR9* mapea en el cromosoma 3, en la región 3p21.3 (una región asociada con varias enfermedades neoplásicas) y posee 2 exones, siendo el segundo exón la principal región codificante (Figura 15). El gen se extiende por aproximadamente 5 kb. (Chuang y Ulevitch, 2000; Du X *et al* 2000).

Figura 15. Mapa del gen *TLR9* en el cromosoma 3p21.3.



Tomado y modificado de Hur *et al.* 2009.

3.4.4. Polimorfismos y asociación con patologías

El gen *TLR9* es polimórfico, con un total de 61 SNPs reportados en Genbank. Los polimorfismos en el gen *TLR9* se han asociado con el desarrollo o progresión de varias enfermedades de origen inmune, infecciosas o tumorales. El más estudiado es el polimorfismo -1237 T/C, ubicado en la región promotora y en el sitio de unión al NF- κ B. Se conoce que la presencia del alelo C incrementa la capacidad de unión de *TLR9* con NF- κ B y por lo tanto la transcripción del gen (Schmausser, 2004). Este polimorfismo ha sido asociado con el desarrollo de dermatitis y eczema (Novak, 2007), con infección por *Helicobacter pylori* (Ng, 2010), desarrollo de linfoma de Hodgkin (Mollaki, 2009) y periodontitis (Holla, 2009).

En población japonesa se han adelantado estudios con el polimorfismo intrónico +1174 G/C y se ha encontrado asociación con el desarrollo y progresión del lupus eritematoso sistémico (Tao *et al.*, 2007). Este mismo polimorfismo, junto con el 1635 A/G, se ha asociado con la progresión de la infección por el virus VIH (Bochud, 2007). Otro de los polimorfismos estudiados es el polimorfismo -1486 T/C ubicado en el promotor y se ha visto relacionado con el desarrollo de malaria (Mockenhaupt, 2006; Sam-Agudu, 2010).

Con respecto a la enfermedad de Chagas, recientemente se reportó un estudio en población brasilera del polimorfismo -1237 en el que no encontraron diferencias estadísticamente significativas entre el grupo de pacientes infectados asintomáticos y los pacientes con cardiomiopatía crónica. (Ramasawmy et al., 2009).

4. JUSTIFICACIÓN

Es claro que el sistema inmune cumple un papel importante en el desarrollo y mantenimiento de la enfermedad de Chagas. En este sentido del 100% de los individuos infectados con *T. cruzi* el 70 % cursan sin sintomatología y sólo el 30 % desarrollan las formas sintomáticas. Lo que nos lleva a preguntarnos ¿Por qué todos los individuos infectados con *Trypanosoma cruzi* no desarrollan la cardiomiopatía chagásica? Para resolver esta pregunta es importante reconocer que el desarrollo de la enfermedad de Chagas obedece a la interacción entre el genoma del hospedero, del parásito y el medio ambiente. Por lo tanto, diferencias genéticas entre los individuos infectados podrían ser las responsables de las diferencias observadas en las formas de presentación clínica y en la severidad de la enfermedad.

Para contribuir al entendimiento de la inmunopatogénesis de la enfermedad y de Chagas y dado el papel claramente demostrado de la inflamación crónica en el daño tisular, el Grupo de Inmunología y Epidemiología Molecular de la Universidad Industrial de Santander, ha estudiado asociaciones de SNPs en los genes que codifican para citoquinas y otras proteínas del sistema inmune asociadas con la inflamación para determinar su implicación en la susceptibilidad con el desarrollo de la cardiomiopatía chagásica. Entre los genes estudiados se encuentran *IL1B* e *IL12B*, *IGFNG*, *IL6*, *MIF*, *TLR2*, *PTPN22*, *CCR5*, *IL4*, *IL10*.

Conocido el papel fundamental que desempeña TNF-alfa y sus receptores en el proceso inflamatorio, así como también el TLR9, estas proteínas han sido ampliamente estudiadas en relación con su implicación en la progresión de la enfermedad de Chagas. Estudios preliminares en pacientes con cardiomiopatía chagásica crónica muestran niveles elevados en plasma de TNF- α asociados a severidad. El receptor TNFRII puede inhibir la acción del TNF- α y el TLR9

reconoce secuencias CpG no metiladas del ADN de *T. cruzi*. Por lo tanto polimorfismos funcionales como -308 (A/G) y -1031 (T/C) del gen *TNFA*, +196 (T/G) del *TNFRII* y *TLR9* -1237 T/C podrían estar asociados con la susceptibilidad y/o severidad al desarrollo de la cardiomiopatía chagásica. Los resultados de esta investigación, así como también otros realizados por el grupo de investigación, podrían ser utilizados como marcadores inmunogenéticos de susceptibilidad y severidad a la cardiomiopatía chagásica.

5. OBJETIVOS

5.1. OBJETIVO GENERAL

Determinar la influencia de variantes génicas funcionales en los genes *TNFA*, *TNFR* y *TLR9* en la susceptibilidad a desarrollar cardiomiopatía chagásica, en grupos de pacientes seropositivos asintomáticos y pacientes sintomáticos con cardiomiopatía chagásica que residan en zona endémica de Santander.

5.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Determinar y establecer las frecuencias alélicas y genotípicas de los polimorfismos analizados en la población estudiada.
- Determinar la presencia o no de haplotipos entre los polimorfismos analizados basados en el desequilibrio de ligamiento.
- Establecer la asociación de los polimorfismos o haplotipos con susceptibilidad a desarrollar cardiomiopatía chagásica

6. HIPÓTESIS DE TRABAJO

H1: Existe asociación de los polimorfismos *TNFA* -308 (G/A), *TNFA* -1031 (T/C), *TNFR2* +196 (T/G) y *TLR9* -1237 (T/C) con el desarrollo de cardiomiopatía chagásica en población estudiada del área endémica de Santander.

H0: No existe asociación de los polimorfismos *TNFA* -308 (G/A), *TNFA* -1031 (T/C), *TNFR2* +196 (T/G) y *TLR9* -1237 (T/C) con el desarrollo de cardiomiopatía chagásica en población estudiada del área endémica de Santander.

7. MATERIALES Y MÉTODOS

7.1. POBLACIÓN DE ESTUDIO

Se realizó un estudio de casos y controles que incluyó 313 individuos provenientes de municipios de las provincias Guanentina y Comunera del departamento de Santander. Estos individuos han vivido más de 10 años en la zona y a pesar de las estrategias de mejoramiento de la vivienda y campañas de erradicación de vectores domiciliados, aún hay presencia de vectores infectados, especialmente en el peridomicilio (Campbell-ledrum *et al.*, 2007; Guhl *et al.*, 2005, Sandoval *et al.*, 2000). Las condiciones medioambientales y socioeconómicas de los pacientes son similares.

El rango de edad de los individuos estuvo comprendido entre 21 a 85 años con promedios similares entre casos y controles. Los pacientes fueron reclutados en su mayoría en estudios de campo realizados en la zona y complementados en sus análisis clínicos en la Fundación Cardiovascular de Colombia y el Instituto del Corazón de San Gil. El primer criterio de inclusión en el estudio fue la detección en suero de anticuerpos anti *Trypanosoma cruzi*, determinados mediante dos métodos con principios diferentes, como son el ELISA (del inglés, enzyme-linked immunosorbent assay) y la HAI (hemoaglutinación indirecta) (Wiener, Argentina).

Los pacientes sin sintomatología cardíaca y con electrocardiograma normal fueron clasificados como asintomáticos y representaron el grupo control (n=154), por otra parte, los pacientes que por evaluación clínica, electrocardiograma, Holter (24 horas) y ecocardiograma mostraron alteraciones de la conducción y/o cardiopatía estructural fueron clasificados como sintomáticos y representaron el grupo de los casos (n=159).

Todos los pacientes incluidos en el estudio aceptaron participar voluntariamente y firmaron la declaratoria del consentimiento informado (Anexo A). El estudio fue aprobado por el Comité de Ética de la Universidad Industrial de Santander y de la FCV.

7.2. MUESTRAS CLÍNICAS

A todos los pacientes asintomáticos y sintomáticos del estudio se les tomó una muestra de 7 ml de sangre venosa en tubo con anticoagulante EDTA, usada en la extracción de ADN y otra muestra similar en tubo seco utilizada en la obtención del suero para la realización de las pruebas de ELISA y HAI.

7.3. EXTRACCIÓN DEL ADN

La extracción del ADN se realizó mediante el método de *salting-out* (Miller, 1988) con 5ml de sangre anticoagulada con EDTA, los cuales fueron mezclados con 12 ml de solución de lisis de eritrocitos (3M de sucrosa, 10mM de Tris HCl, pH 7.5, 5mM de $MgCl_2$ y 1% de triton X-100). La mezcla fue centrifugada a 2500 rpm por 5 minutos a 4 °C y el precipitado fue tratado con una solución de lisis de leucocitos que contenía 0,024M de EDTA pH 8.0, 50mM NaCl, 10% de SDS y 5M de perclorato de sodio; las proteínas fueron precipitadas en presencia de una solución 6M de NaCl. El sobrenadante se mezcló con 2 volúmenes de isopropanol al 99% para precipitar el ADN y se lavó con etanol al 70%. Finalmente, el ADN extraído se almacenó a -20°C hasta su uso en una solución hidratante de 10mM de Tris HCl pH 7,5 y 1mM de EDTA (TE).

7.4. SELECCIÓN DE LOS POLIMORFISMOS

Se determinaron los polimorfismos -308 G/A del gen *TNFA* (rs 1800629), -1031 T/C del gen *TNFA* (rs1799964), +196 T/G del gen *TNFR1* (rs1061622) y -1237 del gen *TLR 9* T/C (rs57438369) (Asghar, 2004; Tolusso, 2005; Hong, 2007). El principal criterio utilizado en el proceso de selección de los polimorfismos analizados se basó en su funcionalidad, la cual ha sido determinada en numerosos estudios utilizando diferentes tipos celulares (Van der Graaf, 2005; Erridge, 2003). Así mismo, existen reportes de asociación de estos polimorfismos con diferentes tipos de patologías tanto infecciosas, como autoinmunes (Ogus, 2004; Ben-Ali, 2004; Lorenz, 2002; McGuire, 1994; Vandenbroeck y Goris 2003). En todos estos polimorfismos no se conocían las frecuencias en nuestra población, por lo tanto se tuvo en cuenta que las frecuencias alélicas mínimas (FAM) fueran >10% en población Caucásica y/o AfroAmericana, según lo reportado en la base de datos HapMap.

7.5. GENOTIPIFICACIÓN DE LOS POLIMORFISMOS

La determinación de los polimorfismos se realizó utilizando la metodología PCR-RFLP (del inglés, restriction fragment length polymorphisms). Este método tiene como fundamento el reconocimiento en el producto amplificado de un sitio de corte específico para una enzima de restricción, el cual si está presente o no genera fragmentos de diferentes tamaños que determinan las variantes alélicas.

7.5.1. Polimorfismo -308 G/A del gen *TNFA*

Para la tipificación del polimorfismo -308 G/A del gen *TNFA* se utilizaron los iniciadores F (5' – AGG CAA TAG GTT TTG AGG GCC AT - 3') y R (5' –TCC TCC CTG CTCCCG GAT TTC CG - 3'), que amplifican un fragmento de 107 pb

(Gonzalez, *et al.*, 2006). La amplificación se realizó en un volumen final de 20 µl que contenía 1X de buffer de reacción de la polimerasa (Tris-HCl 10mM pH 8,5, KCl 50mM), 3mM de MgCl₂, 200µM de dNTPs (Promega, Madison, WI, EU), 0,5µM de iniciadores (IDT Integrated DNA Technologies Inc, Coralville IA, USA), 0,5 U ADN polimerasa (Tucan-Taq, Corpogen, Col.) y 40nM del ADN a investigar. La amplificación se realizó en un termociclador PT-100 (MJ Research Inc., Waltown MI, USA) (Anexo B).

El producto amplificado fue digerido con 1U de la enzima NcoI (MBI Fermentas, Germany), en un volumen final de 20 µl a 37°C, durante 12 horas. Los fragmentos generados fueron de 87 y 20 pb para el alelo G y 107 pb para el alelo A.

7.5.2. Polimorfismo -1031 T/C del gen *TNFA*

Para la tipificación del polimorfismo -1031 T/C del gen *TNFA* se utilizaron los iniciadores F (5'- TAT GTG ATG GAC TCA CCA GGT -3') y R (5'CCT CTA CAT GGC CCT GTC TT-3') que amplifican un fragmento de 264 pb (Asghar, *et al.*, 2004).

La amplificación se realizó en un volumen final de 20 µl, que contenía 1X de buffer de reacción de la polimerasa (Tris-HCl 100mM pH 8,5, KCl 500mM), 3mM de MgCl₂, 200µM de dNTPs (Promega, Madison, WI, EU), 0,5 µM de iniciadores (IDT Integrated DNA Technologies Inc, Coralville IA, USA), 0,5U de ADN polimerasa (Promega Madison, WI, EU) y 40nM del ADN a investigar.

La amplificación se realizó en un termociclador PT-100 (MJ Research Inc., Waltown MI, USA) (Anexo B). El producto amplificado fue digerido con 1U de la enzima BbsI (MBI Fermentas, Germany), en un volumen final de 20µl a 37°C, por un tiempo de 12 horas. Los fragmentos generados fueron de 251 y 13 pb para el alelo C y fragmentos de 180, 71 y 13 pb para el alelo T.

7.5.3. Polimorfismo + 196 T/G del gen *TNFRII*

Para la tipificación del polimorfismo +196 T/G del gen *TNFRII* se utilizaron los iniciadores F (5' –ACT CTC CTA TCC TGC CTG CT- 3') y R (5' – TTC TGG AGT TGG CTG CGT GT- 3'), que amplifican un fragmento de 242 pb (Tolusso, *et al.*, 2005). La amplificación se realizó en un volumen final de 20µl, que contenía 1X de buffer de reacción de la polimerasa (Tris-HCl 10mM pH 8,5, KCl 50mM), 3mM de MgCl₂, 200µM de dNTPs (Promega, Madison, WI, EU), 0,5µM de iniciadores (IDT Integrated DNA Technologies Inc, Coralville IA, USA), 0,5U de ADN polimerasa (Tucan-Taq, Corpogen, Col.) y 40nM del ADN a investigar. La amplificación se realizó en un termociclador PT-100 (MJ Research Inc., Waltown MI, USA) (Anexo B). El producto amplificado fue digerido con 1U de la enzima BamHI (MBI Fermentas, Germany), en un volumen final de 20µl a 37°C, por 12 horas. Los fragmentos generados fueron de 134 y 108 pb para el alelo T y 242 pb para el alelo G.

7.5.4. Polimorfismo -1237 T/C del gen *TLR9*

Para la determinación del polimorfismo -1237 T/C del gen *TLR9* se utilizaron los iniciadores F (5'– CCT GCT TGC AGT TGA CTG TG – 3') y R (5'– CCC TGT TGA GAG GGT GAC AT – 3') que amplifican un fragmento de 154 (Hong, *et al.*, 2007). La amplificación se realizó en un volumen final de 20 µl, que contenía 1X de buffer de reacción de la polimerasa (Tris-HCl 100mM pH 8,5, KCl 500 mM), 3mM de MgCl₂, 200µM dNTPs (Promega, Madison, WI, EU), 0,5µM de iniciadores (IDT Integrated DNA Technologies Inc, Coralville IA, USA), 0,5U de ADN polimerasa (Tucan-Taq, Corpogen, Col.) y 40nM del ADN a investigar. La amplificación se realizó en un termociclador PT-100 (MJ Research Inc., Waltown MI, USA) (Anexo B). El producto amplificado fue digerido con 1U de la enzima BstNI (MBI Fermentas, Germany), en un volumen final de 15µl a 37°C, por 12 horas. Los

fragmentos generados fueron de 25 y 129 pb para el alelo T y de 25, 48 y 81 pb para el alelo C.

Para todos los polimorfismos estudiados los fragmentos generados fueron evidenciados por electroforesis en gel de agarosa de bajo punto de fusión al 3% (Low-melt ultraclean, MO BIO Laboratories Inc. USA), en buffer TBE 0,5X (Tris-base 89 mM, ácido bórico 89 mM y EDTA-Na 0,05 mM) y bromuro de etidio (0,1 µg/ml). El corrido electroforético se realizó en cámara de electroforesis (Bio Rad, Sub-Cell GT, USA) con buffer TBE 0,5X, a 70 Voltios durante 1 hora. El tamaño de las bandas resultantes se determinó por comparación con un patrón de tamaño molecular (50 pb-GeneRuler MBI-Fermentas, Germany). La visualización de las bandas se realizó por exposición de los geles a luz ultravioleta en un transiluminador (UVP-FS-15E, USA) y se realizó registro fotográfico utilizando una cámara digital (CANON INC. PowerShot A-40, Malaysia). Estos resultados fueron confirmados por otro lector y los desacuerdos fueron repetidos para la asignación del alelo respectivo. Ninguno de los observadores conocía la condición previa del sujeto que analizaba.

7.6. ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Este estudio se basó en un diseño de casos y controles. El tamaño de la muestra fue calculado con un alfa de 0.05 y un poder de 86% utilizando el software Quanto v 0,5 (Department of Preventive Medicine, University of Southern California, California, USA).

Se tomaron como referentes para el cálculo del tamaño de muestra las frecuencias alélicas de los marcadores -1031 T/C y -308 G/A del gen *TNFA*, +196 T/G del gen *TNFR1* y -1237 T/C de gen *TLR 9* según lo reportado en la base de datos HapMap.

A los marcadores -1031 T/C y -308 G/A del gen *TNFA*, +196 T/G del gen *TNFR1* y -1237 T/C de gen *TLR 9* se les estimó el coeficiente de Wright para medir la estructuración de la población (F_{ST}), además ésta fue determinada previamente utilizando 42 marcadores diferentes dando como resultado una baja estructura de la población (0,003) (Zafra 2007). Se realizó un Análisis de Varianza Molecular (AMOVA) (Reynolds *et al.* 1983; Slatkin, 1995), Todos los cálculos se realizaron usando los programas del Software ARLEQUÍN versión 3.11 (Excoffier, 2006).

El cálculo del equilibrio de Hardy-Weinberg (EHW) tanto en el grupo de casos como de controles se determinó utilizando el software Arlequín versión 3.1 (Excoffier, 2006). Las diferencias entre las frecuencias genotípicas y alélicas entre el grupo de sintomáticos y asintomáticos se compararon mediante χ^2 (ji-cuadrado) con tablas de 2 x 3 y de 2 x 2, utilizando el software Statcalc (Epiinfo 2006, CDC). Las razones de posibilidades (OR) se establecieron con un intervalo de confianza del 95%, cuando las frecuencias genotípicas y/o alélicas fueron menores de 5 se utilizó la prueba exacta de Fisher, los valores de $p < 0,05$ fueron considerados estadísticamente significativos. La estimación del desequilibrio de ligamiento (D') entre los polimorfismos *TNFA* -1031 T/C y -308 G/A, así como la construcción de los haplotipos entre estos polimorfismos se estimó utilizando el software Haploview 4.1.

7.7. CONSIDERACIONES ÉTICAS

Esta investigación es clasificada como de riesgo mínimo, de acuerdo con el artículo 11 de la Resolución 008430 de 1993 del Ministerio de Salud, dado que solamente implica la toma de muestra sanguínea para la extracción de suero y ADN. Los pacientes fueron informados del alcance del estudio, la confidencialidad de los resultados y de las posibles complicaciones ocasionadas por la punción venosa y la forma de controlarlas. Todos los pacientes aceptaron participar

voluntariamente en el estudio y firmaron la declaratoria del consentimiento informado (Anexo A). El estudio fue aprobado por el Comité de Ética de la Universidad Industrial de Santander y la FCV.

A cada uno de los pacientes que aceptaron participar en el estudio se les informó de los resultados de las pruebas serológicas y del diagnóstico clínico realizado y dependiendo de su condición se les ofreció seguimiento clínico o cardiológico en la FCV. La información genética obtenida en este estudio representa un avance en el conocimiento, pero su utilidad práctica para el manejo del paciente requiere comprobación en otras poblaciones y el aporte de otros marcadores, por lo tanto esta información no fue suministrada a los pacientes.

8. RESULTADOS

8.1. ANÁLISIS DE LA POBLACIÓN

8.1.1. Variables del estudio

8.1.1.1. Variables demográficas: La base de datos se construyó con información de los pacientes que incluyó edad y género.

Tabla 3. Características demográficas de la población en estudio.

Variablen	Casos	Controles
Femenino	94 (59.1%)	106 (68.8%)
Masculino	65 (40.9%)	48 (31.2%)
Edad (años)	55,5	47,9

El promedio de edad con respecto al género femenino y masculino tanto de casos, como controles fue mayor en el género femenino. (Tabla 3)

Los participantes en el estudio provenían de municipios de las provincias guanentina y comunera (zonas de alta endemia), manifestaron su conocimiento de los vectores y las condiciones socioeconómicas de los grupos fueron similares.

8.1.1.2. Variables Serológicas:

A todos los individuos se les realizaron las pruebas de ELISA y HAI.

8.1.1.3. Variables Clínicas:

La clasificación para evaluar la gravedad de la infección chagásica se realizó según los criterios establecidos por la OMS/OPS. Esta clasificación define cuatro fases de la enfermedad, denominadas Fase I, II, III, IV (Tabla 1).

De acuerdo a la clasificación de la OMS los pacientes se distribuyeron en fase I asintomáticos y en las fases II, III y IV los sintomáticos (Tabla 4).

Tabla 4. Población del estudio clasificado según la gravedad de la cardiomiopatía chagásica

Fases	Nº de pacientes por fase	Porcentaje
Fase I	154	49,2
Fase II	38	12,1
Fase III	86	27,5
Fase IV	35	11,2
Total	313	100

8.1.1.4. Variables genéticas:

Se seleccionaron los polimorfismos funcionales de mayor relevancia según la literatura, los cuales incluyen para el gen *TNFA*, la variante -308 (G/A) y -1031 (T/C); para el gen *TNFR1* la variante +196 (T/G) y para el gen *TLR9* la variante -1237 (T/C).

8.1.2. Estructura poblacional

El Análisis Molecular de Varianza (AMOVA) mostró que los individuos asintomáticos y los sintomáticos no presentan diferencias en términos de su estructura poblacional.

Los resultados obtenidos están a favor de la poca diferenciación poblacional dada por los SNPs evaluados ($F_{ST}= 0,0070$), esto significa que ambos grupos de pacientes se comportan como pertenecientes a una misma unidad genética poblacional (Tabla 5).

Cuando se separaron en dos grupos los individuos sintomáticos independientes de la fase y los asintomáticos, el grupo de individuos asintomáticos presentó menor diferenciación genética ($F_{ST}=0.067$) respecto a los sintomáticos, en donde fue ligeramente mayor ($F_{ST} =0.076$). Todo lo anterior sugiere que el número total de individuos considerados en el presente estudio se comportan dentro de una unidad reproductiva, es decir no hay estructura genética poblacional. Según Hartl & Clark (1997), los valores de F_{ST} por debajo de 0,05 son evidencia de poca estructura poblacional (Anexo C)

Tabla 5. Análisis Molecular de Varianza (AMOVA) a partir de las frecuencias alélicas de tres sistemas SNPs analizados en pacientes chagásicos.

Fuente de variación	Grados de libertad	Suma de cuadrados	Porcentaje de variación
Entre poblaciones	1	0,980	0,71
Entre individuos dentro de poblaciones	311	94,158	0,073
Dentro de individuos	313	94,500	0,123
Total	625	189,637	$F_{ST}=0,007$

8.1.3. Equilibrio de Hardy-Weinberg

Las frecuencias alélicas y genotípicas de los pacientes asintomáticos y de los sintomáticos se encontraron en Equilibrio de Hardy-Weinberg (EHW) en todos los polimorfismos analizados. En el caso del polimorfismo +196 del gen *TNFRII* no se calculó debido a su condición monomórfica (Tabla 6).

Tabla 6. Valores de P para el equilibrio de Hardy-Weinberg de las frecuencias alélicas poblacionales de los SNPs estudiados.

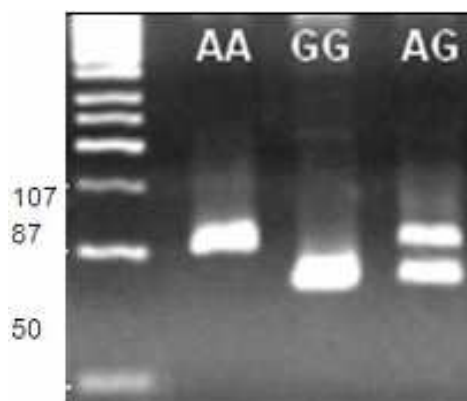
EHW	Grupo	<i>TNFA</i> -308	<i>TNFA</i> -1031	<i>TNFRII</i> +196	<i>TLR9</i> -1237
Valor de <i>p</i>	Asintomáticos	0,79	0,21	NC*	0,61
	Sintomáticos	0,05	0,22	NC*	0,13

*No calculado.

8.2. POLIMORFISMOS DE LOS GENES *TNFA*, *TNFRII* Y *TLR9*

8.2.1. Polimorfismo -308 del gen *TNFA*

Figura 16. Electroforesis en geles de agarosa al 1% de la PCR-RFLP para el polimorfismo -308 del gen *TNFA*



En AA: presencia del alelo A; y, en GG: presencia del alelo G. el fragmento de 107pb corresponde al polimorfismo. La presencia simultánea de bandas polimórficas en ambas electroforesis para el mismo caso, evidencia un genotipo heterocigoto y su presencia en solo una de ellas, evidencia homocigosis del alelo correspondiente

La distribución de las frecuencias alélicas del marcador -308 del gen *TNFA* mostró que el alelo A se encuentra con mayor frecuencia en los pacientes con cardiomiopatía chagásica, siendo de 16,7%, comparado con el 7,1% de los pacientes asintomáticos. El análisis de estas frecuencias mostró diferencias estadísticamente significativas ($p=0,00024$; OR=2,6 IC: 1,5--4,55) asociadas a un alelo de riesgo (Tabla 7). Por su parte, el alelo G fue el más frecuente en los individuos asintomáticos con un porcentaje de 92,9% y en los individuos sintomáticos la frecuencia fue de 83,3% (Tabla 7). Esta diferencia también fue estadísticamente significativa.

Al analizar las frecuencias genotípicas del mismo marcador se observó que el genotipo GG se encontró en un 86,4% en individuos asintomáticos y en 67,3% en los sintomáticos. Esta diferencia fue estadísticamente significativa ($p=0,000067$ OR: 0,33, IC: <0,19-0,58) (Tabla 7) y se asoció a protección.

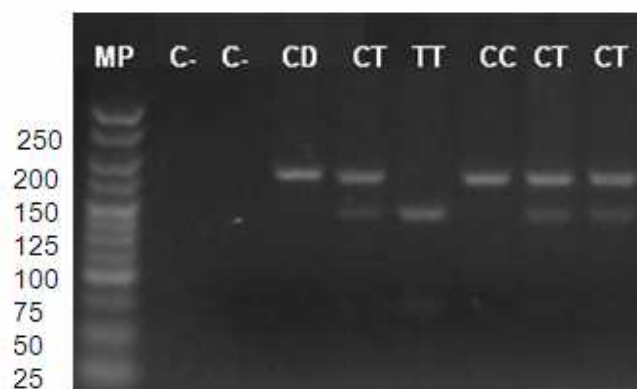
Tabla 7. Frecuencias genotípicas y alélicas del polimorfismo -308 del gen TNFA en individuos asintomáticos y con cardiomiopatía chagásica.

SNP	Alelo/ Genotipo	Pacientes asintomáticos	%	Pacientes con cardiomiopatía chagásica	%	Valor <i>p</i>	OR
TNFA -308	G	286	92,9	265	83,3	0,00024	0,38 0,22-0,67
	A	22	7,1	53	16,7	0,00024	2,6 1,5-4,55
	GG	133	86,4	107	67,3	0000067	0,33 0,19-0,58
	GA	20	13,0	51	32,1	0,000055	3,07 1,73-5,42
	AA	1	0,6	1	0,6	0,74*	0,97 0,03-35

*Prueba de Fisher

8.2.2. Polimorfismo -1031 del gen TNFA

Figura 17. Electroforesis en geles de agarosa al 1% de la PCR-RFLP para el polimorfismo -1031 del gen TNFA.



En TT: presencia del alelo T; y, en CC: presencia del alelo C. Los fragmentos de 180pb+71+13 pb corresponde al polimorfismo. La presencia simultánea de bandas polimórficas en ambas electroforesis para el mismo caso, evidencia un

genotipo heterocigoto y su presencia en solo una de ellas, evidencia homocigosis del alelo correspondiente.

El alelo T del polimorfismo -1031 se encontró con mayor frecuencia en los pacientes asintomáticos (20,5%) comparado con los pacientes con cardiomiopatía chagásica (13,2%). Esta diferencia fue estadísticamente significativa ($p=0.015$; OR = 0.59 IC: 0,38-0,93) (Tabla 8) y se asoció con protección. La distribución de las frecuencias genotípicas de este marcador mostró que el genotipo TT se encuentra en un 5,8 % de los pacientes asintomáticos y en un 0,6% de los sintomáticos con diferencias estadísticamente significativas ($p= 0,008$ OR: 0,59 CI<0,00-0,08) (Tabla 8).

Tabla 8. Frecuencias genotípicas y alélicas del polimorfismo -1031 del gen *TNFA* en individuos asintomáticos y con cardiomiopatía chagásica.

SNP	Alelo/ Genotipo	Pacientes asintomáticos	%	Pacientes con cardiomiopatía chagásica	%	Valor P	OR
TNFA -1031	C	245	79,5	276	86,8	0,015	1,69 1,08-2,65
	T	63	20,5	42	13,2	0,015	0,59 0,38-0,93
	CC	100	64,9	118	74,2	0,074	1,54 0,95-2,5
	CT	45	29,2	40	25,2	0,41	0,82 0,48-1,34
	TT	9	5,8	1	0,6	0,008*	0,1 0,00-0,08

*Prueba de Fisher.

Los polimorfismos del gen de *TNFA* -308 y -1031 están ubicados en la región promotora del gen, estas variantes no se encontraron en desequilibrio de ligamiento ($D'=0,49$). De los 3 haplotipos generados ninguno mostró diferencias

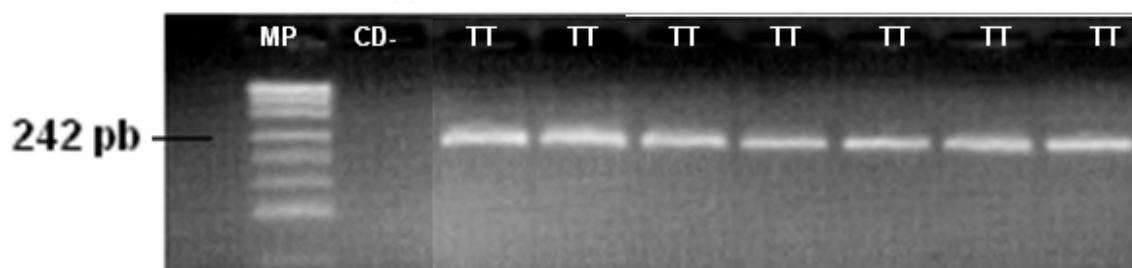
estadísticamente significativas al comparar los dos grupos (Tabla 9). El haplotipo más frecuente tanto en asintomáticos como en los sintomáticos fue el GC con un porcentaje de 72,7 y 81,8% respectivamente.

Tabla 9. Análisis de haplotipos de los polimorfismos -308 y -1031 del gen *TNFA* de pacientes asintomáticos y sintomáticos de la enfermedad de Chagas.

Haplotipos <i>TNFA</i> -1031 y -308	Pacientes asintomáticos	%	Pacientes con cardiomiopatía chagásica	%	P
GT	31	2,1	21	13,3	0,099
GC	112	72,7	130	82,0	0,056
AC	10	6,8	7	4,7	0,414

8.2.3. Polimorfismo +196 del gen *TNFRII*

Figura 18. Electroforesis en geles de agarosa al 1% de la PCR-RFLP para el polimorfismo -1031 del gen *TNFA*.



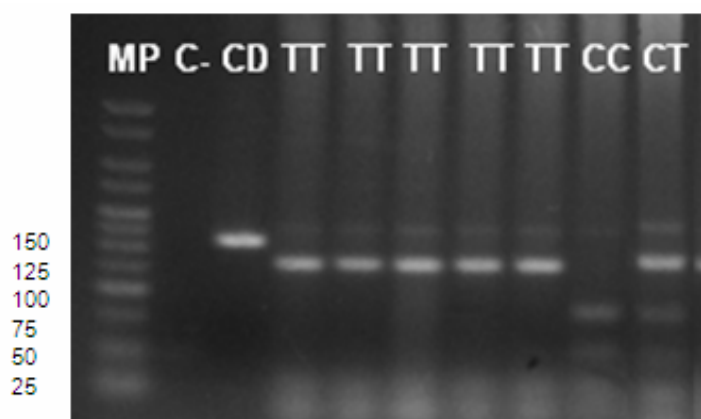
En TT: presencia del alelo T; Los fragmentos de 242pb corresponde al Alelo ancestral. Evidencia en solo una de ellas, evidencia homocigosis del alelo correspondiente TT

El análisis de las frecuencias alélicas y genotípicas del polimorfismo +196 del gen *TNFRII* mostró que el 100% de los individuos caracterizados exhibieron el

genotipo TT, confiriéndole la condición de marcador monomórfico para la población en estudio.

8.2.4. Polimorfismo -1237 del gen *TLR9*

Figura 19. Electroforesis en geles de agarosa al 1% de la PCR-RFLP para el polimorfismo -1031 del gen *TNFA*.



En TT: presencia del alelo T; y, en CC: presencia del alelo C. el fragmento de corresponde al polimorfismo Alelo C: 25pb, 48pb, 81pb. La presencia simultánea de bandas polimórficas en ambas electroforesis para el mismo caso, evidencia un genotipo heterocigoto y su presencia en solo una de ellas, evidencia homocigosis del alelo correspondiente.

En el polimorfismo *TLR9* -1237 no se encontraron diferencias estadísticamente significativas en la distribución de las frecuencias alélicas de los grupos analizados ($p=0,31$). (Tabla 10).

El genotipo TT del marcador TLR 9 fue el más frecuente en los dos grupos con porcentajes similares sin embargo ningún genotipo mostró diferencias estadísticamente significativas.

Tabla 10. Análisis de frecuencias genotípicas y alélicas del polimorfismo - 1237 del gen *TLR9*.

Alelo/ Genotipo	Pacientes asintomáticos	%	Pacientes con cardiomiopatía chagásica	%	Valor de P	OR	
C	41	13,3	34	10,7	0,313	0,78	0,47 -1,30
T	267	86,7	284	89,3	0,313	1,28	0,78 -2,06
CC	2	1,3	0	0,0	0,149	0,32	0,48 -1,26
CT	37	24,0	34	21,4	0,576	0,86	0,49 -1,51
TT	115	74,7	125	78,6	0,409	1,25	0,71 -2,18

9. DISCUSIÓN

Aunque los mecanismos fisiopatológicos y moleculares involucrados en el desarrollo de la Enfermedad de Chagas (EC) aún no se conocen completamente, es evidente que la respuesta inmunológica cumple un papel importante en la mediación del daño tisular en el corazón y otros órganos (Dutra *et al.*, 2009, Ferreira, 2003).

El desarrollo de la EC es el resultado de una compleja interacción entre el hospedero, el parásito y el medio ambiente, donde la carga genética del hospedero podría estar cumpliendo un papel importante en la fisiopatología de la enfermedad. En este sentido, las proteínas involucradas en la respuesta inmune, como citoquinas y quimioquinas, podrían estar relacionadas con la susceptibilidad/resistencia al desarrollo de la cardiomiopatía chagásica crónica (CCC) (Savino *et al.*, 2007). En la EC al igual que en otras enfermedades infecciosas y autoinmunes que involucran procesos inflamatorios crónicos en sus mecanismos inmunopatológicos, se han encontrado asociaciones con polimorfismos en genes de respuesta inmune (Niro, 2005; Qu, 2007; Kamali-Sarvestani, 2006; Waschke, 2005; Vargas-Alarcón, 2006).

En población colombiana, el Grupo de Investigación de Inmunología y Epidemiología Molecular-GIEM ha encontrado asociaciones con polimorfismos en genes que codifican para citoquinas pro-inflamatorias como *IL1B* (Flórez *et al.*, 2006), *IL12B* (Zafra *et al.*, 2007) y *MIF* (Torres *et al.*, 2009), así como también en citoquinas anti-inflamatorias como *TGFB* (Calzada *et al.*, 2009) e *IL-4R* (manuscrito en preparación).

Dado el papel fundamental y la importancia de TNF- α en el proceso inflamatorio esta proteína ha sido ampliamente estudiada como posible marcador biológico o como blanco de acción terapéutica en numerosas enfermedades, entre ellas la EC (Kroll Palhares *et al*, 2008). Su importancia es tal, en el caso de enfermedades inflamatorias crónicas que comercialmente se ha implementado su bloqueo en el tratamiento de enfermedades autoinmunes como la artritis reumatoidea, con resultados importantes, aunque un porcentaje menor de los enfermos no responde al tratamiento (Feldmann, 2001).

El polimorfismo -308 G/A del gen *TNFA* ha sido el más ampliamente estudiado debido a que el alelo A se ha encontrado asociado con un incremento en la transcripción del gen y como consecuencia, con una mayor producción de la proteína (Wilson *et al.*, 1997; Tang *et al* 2000). En nuestro estudio el alelo A se encontró con mayor frecuencia en el grupo de los individuos que desarrollaron CCC comparado con el grupo de asintomáticos, siendo esta diferencia estadísticamente significativa. Este alelo está asociado con mayor producción de la citoquina TNF- α por lo tanto, el resultado es concordante con el papel proinflamatorio de esta citoquina y su participación en la patogénesis de la CCC, debido a que los individuos portadores de este alelo estarían produciendo mayores concentraciones de TNF α en presencia de antígenos de *T. cruzi* y por lo tanto manteniendo un proceso inflamatorio en el tejido cardíaco, que finalmente conduciría a daño tisular y remodelamiento con fibrosis y pérdida funcional.

Estudios adelantados con pacientes chagásicos han encontrado niveles plasmáticos de la proteína ocho veces superiores en los pacientes con CCC cuando se comparan con individuos normales y dos veces superiores cuando la comparación es con individuos asintomáticos o con CCC sin disfunción en la fracción de eyección (Ferreira, 2003). Igualmente estudios que determinan en plasma, no solamente los niveles de TNF- α , sino también los de CCL2, CCL3 y péptido natriurético encontraron una buena correlación entre los niveles de estas

proteínas y el grado de disfunción cardíaca, siendo el TNF- α considerado un excelente predictor de falla cardíaca (Talvani, 2004). Contrario a lo esperado el bloqueo de TNF α con Etanercept (TNFRII), en ensayos experimentales utilizando el modelo de hámster, agravó la cardiomiopatía chagásica al aumentar la disfunción ventricular izquierda, sugiriendo que la ausencia de señales generadas por su presencia podría alterar la comunicación de las quimioquinas en el tejido cardíaco por la acumulación de células inflamatorias y por ende el daño tisular (Bilate, 2007). Sin embargo, Kroll-Palhares en estudios recientes sugiere que la vía de señalización TNF/TNFR1 promueve la miocarditis y el daño del tejido cardíaco por una mayor presencia de linfocitos T CD8+ debido a un aumento en la expresión de CCR5 (Kroll-Palhares, 2008). Todos estos resultados llevan a plantear la necesidad de realizar estudios de interacción entre las diferentes citoquinas, sus receptores, quimioquinas, vías de señalización y su relación con el desarrollo de la cardiomiopatía chagásica, ésto correlacionado con el efecto de los polimorfismos funcionales presentes en sus genes.

Estudios inmunogenéticos en población mexicana, en los que analizan este polimorfismo en EC obtuvieron resultados similares a los nuestros (Rodríguez-Pérez, 2005). Por el contrario, estudios realizados en población peruana y brasilera no encontraron esta asociación (Beraun, 1998; Drigo, 2007). Sin embargo, otro estudio realizado por el mismo grupo brasilero reportó una asociación con disminución en la supervivencia de los pacientes con CCC al encontrar un aumento del alelo A asociado con mayor mortalidad (Drigo, 2006). Estas contradicciones en los resultados de este tipo de estudios no son exclusivas de la EC; de hecho, los análisis de asociación realizados con esta misma variante en leishmaniasis y malaria también reportaron un comportamiento similar (Kamali-Sarvestani *et al.*, 2006; Karplus *et al.*, 2002; Meddeb-Amaoui *et al.*, 2001; Campino, 2009). Vale la pena resaltar las diferencias de las frecuencias del alelo A en las distintas poblaciones, siendo de 13% en el grupo brasilero estudiado, mientras en el de México 24% en pacientes con CCC, 0% en pacientes

asintomáticos y de 4% en pacientes sanos. En nuestro estudio fue de 16,7% en los pacientes con CCC, mientras que en los asintomáticos fue de 7,1 %, incluso estas variaciones son notorias en diferentes regiones colombianas, con frecuencias mayores en población antioqueña comparada con las de Cauca y Santander (González, 2006). Estas discrepancias en los resultados de los estudios de asociación podrían estar dadas por diferencias étnicas entre las poblaciones analizadas, así como también por el tamaño de la muestra empleada en los diferentes estudios. En este sentido y a pesar que los estudios de asociación pueden detectar asociaciones débiles es necesario considerar que en estudios de casos y controles es de gran relevancia un tamaño de muestra adecuado para evitar el sesgo por bajo tamaño, debido a que pueden aparecer resultados falsos positivos. Otro factor a tener en cuenta es la adecuada selección de los controles, quienes deberán ser semejantes a los pacientes en aspectos como origen étnico, exposición a factores ambientales, edad y género; también se debe garantizar la homogeneidad genética de la población determinando la existencia o no de estratificación de la misma (Hattersley & McCarthy, 2005)

El análisis del polimorfismo *TNFA*-1031 en nuestra población está en concordancia con lo reportado en otras poblaciones, en las que el alelo T se ha asociado con protección en enfermedades inflamatorias crónicas como la artritis reumatoide y la enfermedad de Crohn (Waldron-Lynch 2001; Negro 1999). Estos hallazgos podrían estar corroborando el papel de los polimorfismos funcionales presentes en la región promotora del gen *TNFA*, los cuales afectan los niveles de expresión de la proteína y se asocian al desarrollo de la EC. El análisis de los haplotipos generados con estos dos polimorfismos no mostró asociación con la EC en la población estudiada, a pesar de que nuestra evidencia experimental mostró que los individuos con el alelo *TNFA*-308A o *TNFA*-1031C presentan un mayor riesgo a desarrollar la CCC, mientras que los individuos con el alelo *TNFA*-308G o *TNFA*-1031T muestran el efecto contrario. Probablemente se requiera el análisis de un mayor número de variantes funcionales que estén afectando de manera

conjunta la expresión de la proteína para poder tener resultados más concluyentes.

El TNF- α ejerce su función mediante la unión a sus receptores específicos, los cuales, tanto en su estado asociado a la membrana como en su estado soluble, poseen actividad biológica, impidiendo la unión del TNF- α a células efectoras, actuando como inmunoreguladores fisiológicos. Existen dos tipos de receptores para el TNF- α , el TNFRI (p55), ubicado en la superficie de la célula y el TNFRII (p75) con dominio extracelular e intracelular. En estudios en los que se han utilizado ratones deficientes de TNFR la respuesta inflamatoria es más severa.

Los polimorfismos en los genes de receptores de TNF- α podrían jugar un papel en la susceptibilidad a desarrollar enfermedad, debido a que variaciones en los niveles tanto de los receptores expresados en las membranas celulares así como los solubles, podrían inhibir o aumentar el efecto in vivo de TNF- α sobre sus células blanco. En el gen *TNFRII* el polimorfismo +196 ha sido ampliamente estudiado dado que produce un cambio de aminoácido de metionina por arginina, que aunque parece no producir un cambio conformacional significativo, si se encuentra en el exón 6 que codifica el sitio proteolítico que media la liberación del receptor soluble, este hecho unido a la compleja interacción entre el TNF- α y sus receptores podría llevar a que este cambio de aminoácido tenga un efecto funcional por la generación de pequeños cambios estructurales (Peral 2002). Contrario a lo esperado, nuestra población estudiada fue monomórfica para el alelo T, a diferencia de todas las otras poblaciones reportadas en la base de datos NCBI. Siendo el alelo T ancestral, es posible que este marcador se encuentre fijado en la población santandereana y no se han dado presiones selectivas o eventos mutacionales hacia el otro alelo, por lo tanto su frecuencia se mantiene en la población. Otra forma de confirmar este dato es analizar un número mayor de individuos aunque lo encontrado sugiere que la frecuencia de esta variante polimórfica, si la hay, es muy baja. Este hecho lleva a plantear la necesidad de

buscar otro marcador en este gen para poder analizar su posible papel en el proceso inflamatorio y en el desarrollo de la cardiomiopatía chagásica.

Estudios realizados en Francia, Italia y España con pacientes caucásicos, sugieren que polimorfismos en el gen *TNFRII* podrían tener implicaciones en el desarrollo de enfermedades autoinmunes como la espondilitis anquilosante, la artritis reumatoide, el lupus eritematoso sistémico y la enfermedad de Crohn (Lira *et al.*, 2008; Goëb *et al* 2005; Dieudé, *et al.*, 2002; Barton *et al.*, 2001). Sin embargo, concluyen que dado que la acción del TNF- α en estas patologías parece estar mediada por el receptor TNFRII, éste podría constituirse en un marcador implicado en la susceptibilidad a desarrollar o no dichas patologías, pero en el caso de la artritis reumatoidea no permitiría predecir severidad en pacientes de inicio reciente (Goëb *et al* 2005).

En la inmunidad innata además de las moléculas solubles que en algunos casos interactúan con el patógeno en el momento de su entrada, participan proteínas de membrana que reconocen patrones moleculares asociadas a patógenos o PAMs. Dentro de estas proteínas de membrana los receptores tipo Toll son fundamentales y modulan el tipo de respuesta adaptativa que se generará posteriormente. Dentro de estos receptores se ha descrito la importancia en el reconocimiento de *T. cruzi* de TLR2 y TLR4 especialmente y han sido identificados los PAMs con los cuales interactúan (Gazzinelli, 2006; Campos, 2004). Igualmente en estos genes nuestro grupo analizó polimorfismos génicos en la búsqueda de marcadores de asociación con la EC sin resultados positivos, probablemente debidos a la baja frecuencia de las variantes estudiadas en nuestra población (Zafra 2008).

En el grupo de los TLRs se encuentran algunos de localización intracelular cuyos ligandos principales son los ácidos nucleicos de los microorganismos. Este es el caso de TLR9 que une ADN de doble cadena y reconoce secuencias de ADN

CpG, estos dinucleótidos no metilados son frecuentes en el ADN de microorganismos como el *T. cruzi* (Hemmi, 2000; Brown, 2002).

Estudios recientes muestran que ratones infectados con *Trypanosoma cruzi* deficientes de TLR9 y de TLR9 y TLR2 muestran disminución en la producción de IL-12/INF- γ y tienen mayor susceptibilidad a la infección (Bafica *et al.*, 2006); lo que sugiere que el TLR2 y TLR9 cooperan en el control de la replicación del parásito (Bilate y Cunha-neto, 2008) y que la activación de la producción de citoquinas por estos receptores de la inmunidad innata tienen un papel preponderante en la defensa del hospedero (Bilate y Cunha-neto, 2008).

Algunos estudios han sugerido que al activarse TLR9 actúa como un mediador entre la inmunidad innata, dirigiendo la respuesta secundaria hacia Th1 (Latz, 2004). En la búsqueda de marcadores de asociación con enfermedad uno de los polimorfismos más estudiados por su presencia en regiones reguladoras ha sido el polimorfismo -1237, ya que el alelo C está relacionado con una mayor producción de la proteína (Novak, 2007). En nuestra población la frecuencia del polimorfismo (alelo C) fue baja, con un promedio de 12%, comparada con un 88% del alelo T. Al realizar el análisis comparativo entre el grupo de pacientes con CCC y asintomáticos no se obtuvieron diferencias estadísticamente significativas sugiriendo que esta variante no está directamente implicada en el desarrollo de la CCC. Resultados similares han sido recientemente reportados en enfermedades como malaria (Campino, 2009). Análisis de otros polimorfismos funcionales presentes en las regiones reguladoras y estudios de haplotipos de las mismas, podrían ayudar a identificar posibles marcadores de susceptibilidad con el desarrollo y/o la severidad de la Enfermedad de Chagas en estos genes.

La principal limitación encontrada, que es válida para este tipo de estudios, es el tamaño de la muestra y el no contar con exhaustiva información clínica de los dos grupos de estudio. Dado el origen rural de esta patología se dificulta la

consecución y seguimiento de los pacientes. Este mismo hecho llevó a que la frecuencia del género femenino en relación con el masculino, fuera mayor debido a su disponibilidad e interés para asistir a las convocatorias realizadas sin descuidar su jornada laboral.

10. CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

El alelo A del polimorfismo -308 en el gen *TNFA* se encontró en mayor frecuencia en los pacientes chagásicos sintomáticos con diferencias estadísticamente significativas, por lo tanto podría ser considerado un factor de riesgo para el desarrollo de cardiomiopatía chagásica en la población analizada.

El alelo T del polimorfismo -1031 en el gen *TNFA* se encontró en mayor frecuencia en los pacientes chagásicos asintomáticos con diferencias estadísticamente significativas, sugiriendo que actúa como un factor de protección para el desarrollo de cardiomiopatía chagásica en población de zona endémica en Santander, Colombia.

El polimorfismo +196 del gen *TNFR1* no está presente en la población analizada, por lo tanto esta variante es monomórfica y no podría ser utilizada como marcador de asociación en nuestra población.

Las frecuencias alélicas y genotípicas de los grupos de sintomáticos y asintomáticos analizados para el polimorfismo -1237 del gen *TLR9* no presentaron diferencias estadísticamente significativas sugiriendo que en la población analizada no se asocian con el desarrollo de la EC.

Recomendaciones

Ampliar el número de polimorfismos funcionales a estudiar, especialmente aquellos que se encuentran en desequilibrio de ligamiento por el análisis de haplotipos.

Realizar estudios de replicación en otras poblaciones afectadas por la enfermedad.

Continuar la línea de investigación con estudios que permitan la comprobación de la funcionalidad de los polimorfismos analizados.

Adelantar en la misma población, estudios de seguimiento para definir el valor pronóstico de estos polimorfismos.

BIBLIOGRAFIA

- ABEL LC, RIZZO LV, IANNI B, ALBUQUERQUE F, BACAL F, CARRARA D, BOCCHI EA, TEIXEIRA HC, MADY C, KALIL J, CUNHA-NETO E 2001. Chronic Chagas' disease cardiomyopathy patients display an increased IFN- γ response to *Trypanosoma cruzi* infection. EN: J Autoimmun 17: 99-107.
- AGUILLON JC, CRUZAT A, CUENCA J, CUCHACOVIC M. El polimorfismo genético del factor de necrosis tumoral alfa como factor de riesgo en patología. EN: Rev Med Chile 2002;130:1043-1050.
- AHMAD-NEJAD P, HACKER H, RUTZ M, BAUER S, VABULAS RM, WAGNER H. Bacterial CpG-DNA and lipopolysaccharides activate Toll-like receptors at distinct cellular compartments. EN: Eur J Immunol 2002; 32:1958-1968.
- ALIBERTI, J. S., J. T. SOUTO, A. P. MARINO, J. LANNES-VIEIRA, M. M. TEIXEIRA, J. FARBER, R. GAZZINELLI, AND J. S. SILVA. Modulation of chemokine production and inflammatory responses in interferon- γ - and tumor necrosis factor-R1-deficient mice during *Trypanosoma cruzi* infection. Am. J. Pathol. 2001; 158:1433–1440.
- ALMEIDA, I.C, GAZZINELLI R.T. Proinflammatory activity of glycosylphosphatidylinositol anchors derived from *Trypanosoma cruzi*: structural and functional analyses. J. Leukoc. EN: Biol. 2001; 70:467-477.
- ANAYA JM. Descripción molecular del TNF- α . EN: Reumatología, 2003;19(2):120-123
- ANDRADE Z.: Reunión Internacional sobre Enfermedad de Chagas. EN: Sociedad Argentina de Cardiología. Buenos Aires, 1983.
- ANGULO VM, TARAZONA Z, ARISMENDI MJ, JOYA MI, SANDOVAL CM. Distribución de triatominos (Hemiptera: Reduviidae) domiciliarios en 27 municipios de Santander. Memorias Congreso Internacional Investigación y Salud. Bogotá. EN: Biomédica; 1997;17(supl 1):79.

- ANGULO VM, TARAZONA Z, REYES A, GUTIÉRREZ R, SANDOVAL CM. Programa Nacional de Prevención y Control de la Enfermedad de Chagas y la Cardiopatía Infantil. Nodo Nor-Oriental-CINTROP UIS (Arauca-Norte de Santander-Santander). EN: Memorias Curso Taller Internacional Control y Manejo de la Tripanosomiasis Americana, Bucaramanga. Julio 1999. p. 99-108.
- ANGULO VM. Comportamiento de *Triatoma dimidiata*: un reto para su control. En: Resúmenes XII Congreso de Parasitología y Medicina Tropical. Bogotá. EN: Biomédica; 2005a:80-82.
- ANGULO VM. Ensayo de estrategias de control y vigilancia de *Triatoma dimidiata* en Colombia. En: Guhl F, editor. Primer Taller Internacional Sobre Control de la Enfermedad de Chagas; Curso de Diagnóstico, Manejo y Tratamiento de la Enfermedad de Chagas. VI Reunión de la Iniciativa Andina para el control de la Enfermedad de Chagas. Bogotá D.C. EN: Ediciones Uniandes; 2005. p .91-102.
- ANGULO VM, ESTEBAN L. Evidencias morfológicas del proceso de adaptación de *Rhodnius prolixus* Stal (Hemiptera: Reduviidae) silvestres hacia los domicilios humanos en los Llanos Orientales de Colombia. EN: XVIII Congreso Latinoamericana de Parasitología-FLAP, Venezuela. Octubre, 2007.
- ANTÚNEZ MI, CARDONI RL. IL-12 and IFN- γ production and NK cell activity, in acute and chronic experimental *Trypanosoma cruzi* infections. EN: Immunol Lett. 2000; 71:103-109.
- ASGHAR T, YOSHIDA S, KENNEDY S, NEGORO K, ZHUO W, HAMANA S, MOTOYAMA S, NAKAGO S, BARLOW D, MARUO T. The tumor necrosis factor- α promoter -1031C polymorphism is associated with decreased risk of endometriosis in a japanese population. EN: Hum Reproduct 2004; 19(11):2509-2514
- BAFICA A, SANTIAGO HC, GOLDSZMID R, ROPERT C, GAZZINELLI RT, SHER A. Cutting edge: TLR9 and TLR2 signaling together account for MyD88-dependent control of parasitemia in *Trypanosoma cruzi* infection. EN: J Immunol. 2006; 177: 3515-3519.

- BARTON A, JHON S, OLLIER, SILMAN A, Worthington, "Associazione between rheumatoid arthritis and polymorphism of tumor necrosis factor receptor II, but not tumor necrosis factor receptor I, in caucasians, *Arthritis Rheumatism* 2001, vol. 44; 1:61-65.
- BARBER RC, ARAGAKI CC, RIVERA –CHAVEZ FA, PURDUE GF, HUNT JL, HORTON JW. TLR and TNF- α polymorphism are associated with an increased risk for severe sepsis following burn injury. *J Med Genet.* 2004; 41: 808- 813.
- BARRETT JC, FRY B, MALLER J, DALY MJ: Haploview: analysis and visualization of LD and haplotype maps. EN: *Bioinformatics.* 2005 21:263-265.
- BEN-ALI M, BARBOUCHE MR, BOUSNINA S, CHABBOU A, DELLAGI K. Toll-like receptor 2 Arg677Trp polymorphism is associated with susceptibility to tuberculosis in Tunisian patients. EN: *Clin Diagn Lab Immunol* 2004; 11(3): 625-626.
- BENHAMOU S, LEE WJ, ALEXANDRIE AK, BOFFETA P, BONCHARDY C, BUTKIEWICZ P, et al. Meta- and pooled analyses of the effects of glutathione S-transferase M1 polymorphisms and smoking on lung cancer risk. EN *Carcinogenesis.* 2002; 23: 1343-1350.
- BERAÚN Y, NIETO A, COLLADO MD, GONZÁLEZ A, MARTÍN J. Polymorphisms at tumor necrosis factor (TNF) loci are not associated with Chagas' disease. EN: *Tissue Antigens* 1998; 52:492-496
- BILATE A, CUNHA-NETO E. Chagas Disease Cardiomyopathy: Current Concepts Of An Old Disease Rev. EN: *Inst. Med. trop. S. Paulo*, March-April, 2008; 50(2):67-74.
- BILATE AM, SALEMI VM, RAMIRES FJ, DE BRITO T, RUSSO M, FONSECA SG, FAÉ KC, MARTINS DG, SILVA AM, MADY C, KALIL J, CUNHA-NETO E TNF blockade aggravates experimental chronic Chagas disease cardiomyopathy. *Microbes* EN: *Infect.* 2007; 9: 1104-1113.
- BOCHUD PY, HERSBERGER M, TAFFÉ P, BOCHUD M, STEIN CM, RODRIGUES SD, CALANDRA T, FRANCIOLI P, TELENTI A, SPECK RF,

- ADEREM A; Swiss HIV Cohort Study. Polymorphisms in Toll-like receptor 9 influence the clinical course of HIV-1 infection. EN: AIDS. 2007; 21 (4):441-446.
- BOTSTEIN D, RISCH N. Discovering genotypes underlying human phenotypes: past successes for mendelian disease, future approaches for complex disease. EN: Nat Genet. 2003; 33 Suppl: 228-237.
 - BOURDI M, MASUBUCHI Y, REILLY TP, Amouzadeh HR, Martin JL, George JW, Shah AG, Pohl LR: Protection against acetaminophen-induced liver injury and lethality by interleukin 10: role of inducible nitric oxide synthase. EN: Hepatology 2002; 35:289-298.
 - BRIDGES S, JENQ G, MORAN M, KUFFNER T, WHITWORTH WC, MCNICHOLL J. Single-Nucleotide Polymorphisms in Tumor Necrosis Factor Receptor Genes. Definition of Novel Haplotypes and Racial/Ethnic Differences. EN: Arthritis Rheum 2002; 46(8): 2045-2050.
 - BROWN WC, CORRAL RS. Stimulation of B lymphocytes, macrophages, and dendritic cells by protozoan DNA. EN: Microbes Infect 2002; 4: 969-974.
 - CABRERA M, SHAW MA, SHARPLESS C, WILLIAMS H, CASTES M, CONVIT J, BLACKWELL JM. Polymorphism in tumor necrosis factor genes associated with mucocutaneous leishmaniasis. EN: J.Exp.Med.1995; 182: 1259-1264.
 - CALLARD RE Y GEARING AJ. The cytokine factsbook. Ed 1^a. New York, NY, EN: Editorial Academic Press Inc., 1994, p. 265.
 - CALZADA JE, NIETO A, BERAUN Y, MARTIN J: Chemokine receptor CCR5 polymorphisms and Chagas' disease cardiomyopathy. EN: Tissue Antigens .2001^a; 58:154-158.
 - CALZADA JE, BERAUN Y, GONZALEZ CI, MARTIN J: Transforming growth factor beta 1 (TGFbeta1) gene polymorphisms and Chagas disease susceptibility in Peruvian and Colombian patients. EN: Cytokine. 2009; 45:149-153.
 - CAMPINO S, FORTON J, AUBURN S, et al. TLR9 polymorphism in African populations: no association with severe malaria, but evidence of cis- variants acting on gene expression. EN: Malaria Journal. 2009; 8:44.

- CAMPOS, M.A.; CLOSEL, M.; VALENTE, E.P. *et al.* - Impaired production of proinflammatory cytokines and host resistance to acute infection with *Trypanosoma cruzi* in mice lacking functional myeloid differentiation factor 88. EN: J. Immunol. 2004; 172: 1711-1718.
- CAMPOS, M.A. & GAZZINELLI, R.T. - *Trypanosoma cruzi* and its components as exogenous mediators of inflammation recognized through Toll-like receptors. EN: Mediators Inflamm. 2004; 13: 139-143.
- CARDONIR., ANTUNEZ M & ABRAMI A.: Respuesta TH1 em la infeccion experimental com *Trypanosoma cruzi*. EN: Medicina (Buenos Aires) 1999; 59:84.
- CHAGAS C. Nova tripanozomiasis humana. Estudos sobre a morfologia e o ciclo evolutivo do *Schizotrypanum cruzi* n.gen. n.sp., agente etiológico de nova entidade morbida do homem. EN: Mem Inst Oswaldo Cruz, 1909;1: 159-218.
- CHUANG TH, ULEVITCH RJ. Cloning and characterization of a sub- family of human toll-like receptors: hTLR7, hTLR8 and hTLR9. EN: Eur Cytokine Netw. 2000; 11:372-378.
- COLORADO IA, ACQUATELLA H, CATALIOTI F, FERNANDEZ MT, LAYRISSE Z: HLA class II DRB1, DQB1, DPB1 polymorphism and cardiomyopathy due to *Trypanosoma cruzi* chronic infection. EN: Hum Immunol 2000;61: 320-325.
- COLLINS FS, GUYER MS, CHARKRAVARTI A. Variations on a theme: cataloging human DNA sequence variation. EN: Science 1997; 278: 1580-1581.
- CORNÉLIE S, HOEBEKE J, SCHACHT AM, BERTIN B, VICOONE J, CAPRON M, RIVEAU G. Direct Evidence that Toll-like Receptor 9 (TLR9) Functionally Binds Plasmid DNA by Specific Cytosine-phosphate-guanine Motif Recognition. EN: J Biol Chem 2004; 279(15):15124-15129.
- CORREA P, GÓMEZ L, ANAYA J. Polimorfismo del TNF- α en Autoinmunidad y Tuberculosis. EN: Biomédica. 2004; 24 (Supl.): 43-51.

- CORREA P.A., GÓMEZ L.M., CADENA J., ANAYA J.M. "Autoimmunity and tuberculosis. Opposite association with TNF polymorphism". EN: J Rheumatol 2005; 32: 219-224.
- COURA JR. Chagas disease: what is known and what is needed - a background article. EN: Mem Inst Oswaldo Cruz. 2007; 102 (Supl. I): 113-122.
- COURA J, PINTO, JC. Epidemiology, control and surveillance of Chagas disease - 100 years after its discovery EN: Mem Inst Oswaldo Cruz. 2009 .Vol. 104(Supl. I): 31-40.
- CUNHA-NETO E, NOGUEIRA L, TEIXEIRA P, RAMASAWMY R, DRIGO S, GOLDBERG AC, FONSECAN S, BILATE A, KALIL J. Immunological and non-immunological effects of cytokines and chemokines in the pathogenesis of chronic Chagas disease Cardiomyopathy. EN: Mem Inst Oswaldo Cruz. 2009; Vol. 104(Supl. I): 252-258.
- D'ALFONSO S Y RICCIARDI PM. A polymorphic variation in a putative regulation box of the TNFA promoter region. EN: Immunogenetics 1994; 39:150-154.
- D'ALFONSO S Y RICHARD PM. An intragenic polymorphism in the human tumor necrosis factor alpha (TNFA) chain-encoding gene. EN: Immunogenetics 1996; 44:321-322.
- D'ALFONSO S, RAMPI M, ROLANDO V, GIORDANO M, MOMIGLIANO-RICCIARDI P: New polymorphisms in the IL-10 promoter region. Genes Immun 2000;1: 231-233.
- DEICHMANN K, BARDUTZKY J, FORSTER J, HEINZMANN A, KUEHR J: Common polymorphisms in the coding part of the IL4-receptor gene. EN: Biochem Biophys Res Commun.1997; 231:696-697.
- DELGADO- VEJA AM, MARTIN J, GRANADOS J, ANAYA JM. Epidemiología genética de La artritis reumatóide: ¿qué esperar de America latina? EN: Biomédica. 2006; 26: 562-84.

- DIAS, E.; LARANJA, F.S.; MIRANDA, A. & NOBREGA, G. - Chagas' disease: a clinical, EN: Epidemiologic, and pathologic study. EN: Circulation, 1956; 14: 1035-1060.
- DIEUDÉ P, PETIT, E.CALLILLEAU-MOINDRAULT, et al., Association between tumor necrosis factor receptor II and familial, but not sporadic, rheumatoid arthritis: Evidence for genetic heterogeneity. EN: Arthritis Rheumatism, 2002; vol. 46; 8: 2039-2044.
- DINARELLO CA Y MOLDAWER LL. Proinflammatory and anti-inflammatory cytokines in rheumatoid arthritis. EN: A primer for clinicians.1999; Amgen, Thousand Oaks, CA, USA,
- DRIGO SA, CUNHA-NETO E, IANNI B, CARDOSO MR, BRAGA PE, FAE KC, NUNES VL, BUCK P, MADY C, KALIL J, GOLDBERG AC. TNF gene polymorphisms are associated with reduced survival in severe Chagas' disease cardiomyopathy patients. EN: Microbes Infect 2006. 8: 598-603.
- DRIGO SA, CUNHA-NETO E, IANNI B, MADY C, FAE KC, BUCK P, KALIL J, GOLDBERG AC. Lack of association of tumor necrosis factor- α polymorphism s with Chagas disease in Brazilian patients. EN: Immunol Lett, 2007; 108: 109-111.
- DUTRA W, SILVA C, AMARAL F, CARNEIRO G, MORAIS DA SILVEIRA A, REIS, D, GOLLOB K . Cellular and genetic mechanisms involved in the generation of protective and pathogenic immune responses in human Chagas disease. EN: *Mem Inst Oswaldo Cruz*, Rio de Janeiro, 2009; Vol. 104(Suppl. I): 208-218.
- DU X, POLTORAK A, WEI Y BEUTLER B. Three novel mammalian toll-like receptors: gene structure, expression, and evolution. EN: *Europ. Cytokine Netw.* 2000; 11: 362-371.
- DUTRA, W. *et al.* The clinical immunology of human Chagas disease. EN: *Trends Parasitol.* 2005; Vol. 21; 581 - 587.
- ENGELMANN H, NOVICK D, WALLACH D. Two tumor necrosis factor-binding proteins purified from human urine. Evidence for immunological cross-reactivity

with cell surface tumor necrosis factor receptor. EN: J Biol Chem. 1990; 265:1531-1536.

- ERRIDGE C STEVARD J, POXTON IR, Monocytes heterozygous for the Asp299Gly and Thr399Ile mutations in the Toll-like receptor 4 gene show no déficit in lipopolysaccharide signalling. EN: j. EXp. Med. 2003; 197: 1787-1791.
- EXCOFFIER L, LAVAL G, SCHNEIDER S: Arlequin (version 3.0): An integrated software package for population genetics data analysis. EN: Evol Bioinform Online 2006; 1:47-50.
- FALFÁN R. Factor de necrosis tumoral: Actividad biológica en neuropatías intersticiales. EN: Rev Inst Nal Enf Resp Mex Volumen 15 - número 1. Enero - marzo 2002 Págs. 48-53.
- FELDMANN M Y MAINI RN. Anti-TNF α therapy of rheumatoid arthritis: what have we learned?. EN: Annu Rev Immunol 2001; 19:163-196.
- FERNÁNDEZ- MESTRE MT, LAYRISSE Z, MOONTAGNANI S, ACQUATELLA M, CATALIOTI F, MATOS M, BALBAS O, MAKHATADZE N, DOMÍNGUEZ E, HERRERA F, MADRIGAL A. Influence of the HLA class II polymorphism in chronic Chagas'disease. EN: Parasite Immunol. 1998; 20: 197-203.
- FERREIRA RC, IANNI BM, ABEL LC, BUCK P, MADY C, KALIL J, CUNHA-NETO E. Increased plasma levels of tumor necrosis factor- α in asymptomatic/"indeterminate" and Chagas disease cardiomyopathy patients. EN: Mem Inst Oswaldo Cruz. 2003; 98: 407-411.
- FIELD M, Tumor necrosis factor polymorphism in rheumatoid arthritis diseases. Q J Med. EN: 2001; 94: 237-46.
- FLANDIN J. CHANO F, DEXCOTEAUX, A. RNA interference reveals a role for TLR2 and TLR3 in the recognition of leishmania donovani promastigotes by interferon- gamma -primed macrophages. EN: Eur.J.Immunol. 2006, 36; 411-420.
- FLÓREZ O, ZAFRA G, MORILLO C, MARTÍN J, GONZÁLEZ CI. Interleukin-1 gene cluster polymorphism in Chagas disease in a Colombian case-control study. EN: Hum Immunol 2006; 67: 741-748.

- FREITAS, H.F.; CHIZZOLA, P.R.; PAES, A.T.; LIMA, A.C. & MANSUR, A.J. Risk stratification in a Brazilian hospital-based cohort of 1220 outpatients with heart failure: role of Chagas' heart disease. EN: Int. J. Cardiol. 2005, 102: 239-247. I
- FUENMAYOR C, HIGUCHI ML, CARRASCO H, PARADA H, GUTIERREZ P, AIELLO V, PALOMINO S 2005. Acute Chagas' disease: immunohistochemical characteristics of T cell infiltrate and its relationship with *T. cruzi* parasitic antigens. EN: Acta Cardiol. 2005; 60: 33-67.
- GALLAGHER G, ESKADALE J, OH HH, RICHARDS S, CAMPBELL DA, FIELD M. Polymorphism in the TNF gene cluster and MHC serotypes in the West of Scotland. EN: Immunogenetic. 1997; 45:188-194.
- GAZINELLI RT, ROPERT C, CAMPOS MA. Role of the Toll/interleukin-1 receptor signalling pathway in host resistance and pathogenesis during infection with protozoan parasites. EN: Immunological Rev. 2004; 201:9-25.
- GAZINELLI RT, DENKERS EY, Protozoan encounters with Toll-like receptors signalling pathways: implications for host parasitisms. EN: Nat rev Immunol. 2006; 6: 895-906.
- GAZINELLI R, CAMPOS A. Role of the Toll/ interleukin 1 receptor signalling pathway in host resistance and pathogenesis during infection with protozoan parasites. EN: Immunol. Rev. 2001; 9-25.
- GOËB V, DIEUDÉ F, VITTECOQ O, MEJJAD O, *et al*. Association between the *TNFRII* 196R allele and diagnosis of rheumatoid arthritis. EN: Arthritis Res Ther. 2005; 7(5): 1056–1062.
- GOMES JA, BAHIA-OLIVEIRA LM, ROCHA MO, MARTINS-FILHO OA, GAZZINELLI G, CORREA-OLIVEIRA R. Evidence that development of severe cardiomyopathy in human Chagas' disease is due to a Th1-specific immune response. EN: Infect Immun 2003; 71: 1185-1193.
- GOMES J, BAHIA-OLIVEIRA L, ROCHA M, BUSECK S, TEXEIRA M, SILVA J, *et al*. Type I chemokine receptor expression in Chagas 'disease correlate with morbidity in cardiac patients. EN: Inf Immun 2005; 73: 7960-7966.

- GONZÁLEZ CL, MORENO OM, SAAIBI D, OTERO W, BADILLO R, MARTÍN M, RAMÍREZ G. Polimorfismos en la región promotora del gen del TNF α en artritis reumatoidea. EN: Salud UIS. 2006; 38: 197-203.
- GRELL M, WAJANT H, ZIMMERMANN G, SCHEURICH P. The type 1 receptor (CD120a) is the high-affinity receptor for soluble tumor necrosis factor. EN: Proc Natl Acad Sci USA. 1998; 95:570-575.
- GROSSE, I., BERNAOLA-GALVÁN, P., CARPENA, P., ROMÁN-ROLDÁN, R., OLIVER, J., STANLEY, H.E. Analysis of symbolic sequences using Jensen-Shannon divergence. EN: Phys. Rev. E. 2002; 65: 041-905.
- GUHL F, VALLEJO GA. Interruption of Chagas disease transmission in the Andean Countries: Colombia. EN: Mem Inst Oswaldo Cruz. 1999; 94(1):413-415.
- GUHL F, AGUILERA G, PINTO N, VERGARA D. Actualización de la distribución geográfica y ecoepidemiología de la fauna de triatominos (Reduviidae: Triatominae) en Colombia. 2007. EN: Biomédica 2007; 27(1):143-162.
- GUHL F, RESTREPO M, ANGULO V, ANTUNES C, CAMPBELL-LENDRUM D, DAVIES C. Lessons from a national survey of Chagas disease transmission risk in Colombia. EN: Trends in Parasitology, 2005, Vol.21 No.6 June.
- GUHL, F. Chagas disease in Andean countries. EN: Mem Inst Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro 2007., Vol. 102(Suppl. I): 29-37.
- GUHL F. Estado actual del control de la enfermedad de Chagas en Colombia. EN: Medicina Buenos Aires. 1999; 59: 103-116.
- GUTIERREZ, R *ET AL*. Comparison of four serological tests for the diagnosis of Chagas disease in a Colombian endemic area. En: Parasitology Vol. 129 (2004); p. 439 - 444.
- HAJEER AH, HUTCHINSON IV. Influence of TNF α gene polymorphisms on TNF α production and disease. EN: Hum Immunol 2001; 62: 1191-9.

- HATTERSLEY A, MCCARTHY M. What makes a good genetic association study? EN: Lancet. 2005, Oct 8; 366(9493): 1315-23.
- HERRMANN SM, RICARD S, NICAUD V et al. Polymorphism of the tumor necrosis factor-alpha gene, coronary heart disease and obesity. EN: Eur J Clin Invest. 1998; 28:59-66.
- HEMMI H, TAKEUCHI O, KAWAI T, KAISHO T, SATO S, SANJO H *et al.* A Toll-like receptor recognizes bacterial DNA. EN: Nature. 2000; 408:740-745
- HIGUCHI T, SEKI N, KAMIZONO S et al. Polymorphism of the 5' flanking region of the human tumor necrosis factor (TNF)- α gene in Japanese. EN: Tissue Antigens. 1998; 51:605-612.
- HIGUCHI ML, BENVENUTI LA, MARTINS RM, METZGER M: Pathophysiology of the heart in Chagas' disease: current status and new developments. EN: Cardiovasc Res 2003; 60:96-107.
- Hill AVS. The immunogenetics of human infectious diseases. EN: Ann Rev Immunol. 1998; 16:593-617.
- HOLLA LI, VOKURKA J, HRDLICKOVA B, AUGUSTIN P, FASSMANN A. Association of Toll-like receptor 9 haplotypes with chronic periodontitis in Czech population. EN: J Clin Periodontol. 2009; 37(2):152-159.
- HONG J, LEUNG E, FRASER A, MERRIMAN T, VISHNU P, KRISSANSEN G. TLR2, TLR4 and TLR9 polymorphisms and Crohn's disease in a New Zealand Caucasian cohort. EN: Journal of Gastroenterology and Hepatology 2007; 22:1760–1766.
- HORNG T, BARTON GM, FLAVELL RA, MEDZHITOV R. The adaptor molecule Tirap provides signalling specificity for toll- like receptors. EN: Nature . 2002; 420:329-333
- HORNUNG V, ROTHENFUSSER S, BRITSCH S, KRUG A, JAHRSDORFER B, GIESE T et al. Quantitative expression of toll-like receptor 1-10 mRNA in cellular subsets of human peripheral blood mononuclear cells and sensitivity to CpG oligodeoxynucleotides. EN: J Immunol. 2002; 168:4531-4537.

- HUIZINGA TW, PISETSKY DS, KIMBERLY RP. Associations, populations, and the truth: recommendations for genetic association studies in Arthritis & Rheumatism. EN: Arthritis Rheum 2004; 50:2066- 71.
- HUR et al. *TLR9* gene polymorphism in Korean patients with SLE. EN: Tissue Antigens. 2005; 65: 266-270.
- IBELGAUFTS H. Dictionary of cytokines. Ed. 5^a. New York, NY: Editorial VCH, 1995, p. 777.
- INIESTA R, GUIÑÓ E, MORENO V. Análisis estadístico de polimorfismos genéticos en estudios epidemiológicos. Gaceta Sanitaria.Barcelona, 2005; Julio-agosto: v.19 n.4.
- INTERNATIONAL HUMAN GENOME SEQUENCING CONSORTIUM. Finishing the euchromatic sequence of the human genome. EN: Nature 2004; 431: 931-945.
- INOKO H, TROWSDALE J. Linkage of TNF genes to the HLA-B locus. EN: Nucleic Acids Res. 1987; 15: 8957-8962.
- IWASAKI A, MEDZHITOV R. toll- like receptors in systemic autoimmune disease. EN: Nature Immunol. 2004; 5: 987-995.
- JANKOVIC D, SHER A, YAP G: Th1/Th2 effector choice in parasitic infection: decision making by committee. EN: Curr Opin Immunol 2001; 13:403-409.
- JEFFERIES, CA, DOYLE S, BRUNNER C, DUNNE et al. Bruton's tyrosine kinase is a toll/interleukin-1 receptor domain binding protein that participates in nuclear factor kappa β activation by toll-like receptor 4. EN: Jbiol Chem. 2003; 278 (28): 26258, 26264.
- JOHN S, SHEPHARD N, LIU G, ZEGGINI E, CAO M, CHEN W, et al. Whole-genome scan, in a complex disease, using 11,245 single-nucleotide polymorphisms: comparison with microsatellites. EN: Am J Hum Genet 2004; 75:54-64

- KARPLUS T, JERONIMO S, CHANG H, et al. Association between the tumor necrosis factor locus and the clinical outcome of *Leishmania chagasi* infection. Infect Immun. 2002; 70:6919-25.
- KAMALI-SARVESTANI E, et al. Cytokine gene polymorphism and susceptibility to cutaneous leishmaniasis in Iranian patients. EN : Cytokine. 2006; 35: 159-65.
- KEANE J, GERSHON S, WISE RP, MIRABILE-LEVENS E, KASZNICA J, SCHWIETERMAN WD, et al. Tuberculosis associated with Infliximab, a tumor necrosis factor alphanetralizing agent. EN: N Engl J Med. 2001; 345:1098-104.
- KOLLIAAS G, DOUNI E, KASSIOOTIS G, KONTOYIANNIS D. The function of tumor necrosis factor and receptors in models of multi-organs inflammation, rheumatoid arthritis, multiple sclerosis and inflammatory bowel disease. EN: Ann Rheum Dis. 1999; 58 (Suppl I):I32-I39.
- KOGA R, HAMANO S, KUWATA H, ATARASHI K, OGAWA M, HISAEDA H, YAMAMOTO M, AKIRA S, HIMENO K, MATSUMOTO M et al. TLR dependent induction of IFN-beta mediates host defense against Trypanosoma cruzi. EN:J Immunol. 2006, 177:7059-7066.
- KOPP,E.,MEDZHITOV,R.,Recognition of infection by toll- like receptors. EN: Curr. Opin. Immunol. 2003; 15: 396-401.
- KROLL-PALHARES K, SILVÉRIO JC, SILVA AA, MICHAILOWSKY V, MARINO AP, SILVA NM, CARVALHO CM, PINTO LM, GAZZINELLI RT, LANNES-VIEIRA J. TNF/TNFR1 signaling up-regulates CCR5 expression by CD8+ T lymphocytes and promotes heart tissue damage during Trypanosoma cruzi infection: beneficial effects of TNF-alpha blockade. EN: Mem Inst Oswaldo Cruz. 2008; 103(4): 375-85.
- LANGHORNE J, CROSS C, SEIXAS E, LI C, VON DER WT: A role for B cells in the development of T cell helper function in a malaria infection in mice. EN: Proc Natl Acad Sci U S A. 1998; 95:1730-1734.

- LATZ E, SCHOENEMEYER A, VISINTIN A et al. TLR9 signals after translocating from the ER to CpG DNA in the lysosome. EN: Nature immune. 2002; 416:603-607.
- LAYRISSE Z, FERNÁNDEZ MT, MONTAGNANI S, MATOS M, BALBAS O, HERRERA F, COLORADO IA, CATALIOTI F, ACQUATELLA H. HLA-C*03 is a risk factor for cardiomyopathy in Chagas disease. EN: Human Immunol. 2000; 61:925-929.
- LE BEAU MM, LEMONS RS, ESPINOSA R, III, LARSON RA, ARAI N, ROWLEY JD: Interleukin-4 and interleukin-5 map to human chromosome 5 in a region encoding growth factors and receptors and are deleted in myeloid leukemias with a del(5q). EN: Blood 1989; 73: 647-650.
- LEVY D, MARIE I, SMITH E , PRAKASH, A. Enhancement and diversification of IFN induction by IRF-7 mediated positive feedback. EN: J Interferon Cytokine Res. 2002; 22: 87-93
- LIRA M, GANTES M, et al. El polimorfismo del receptor II del TNF α en la espondilitis anquilosante. EN: Reumatol Clin. 2008; 4(supl 2): 1-196.
- LLANES E, QUIRALTE J, LOPEZ E, SASTRE B, CHACARTEGUI M, DEL P, V, PALOMINO P, LAHOZ C, CARDABA B: Analysis of polymorphisms in olive pollen allergy: IL13, IL4RA, IL5 and ADRB2 genes. EN: Int Arch Allergy Immunol. 2009; 148:228-238.
- LLOP F, ROTHHAMMER F, ACUÑA M, APT E. HLA antigens in cardiomyopathic Chilean chagasics. EN: Am J Hum Genet. 1988; 43: 770-773.
- LORENZ E, MIRA JP, FREES KL, SCHWARTZ DA. Relevance of mutations in the TLR4 receptor in patients with gram-negative septic shock. EN: Arch Intern Med. 2002; 162(9): 1028-1032.
- LIU Z, HSU H, GOEDDEL DV, KARIN M. Dissection of TNF receptor 1 effector functions: NK activation is not linked to apoptosis while NF- κ B activation prevents cell death. EN: Cell. 1996; 87:565-576.

- MALDONADO RA, IRVINE DJ, SCHREIBER R, GLIMCHER LH: A role for the immunological synapse in lineage commitment of CD4 lymphocytes. EN: Nature 2004; 431:527-532.
- MCGUIRE W, HILL AVS, Allsop CEM, Greenwood BM, Kwiatkowski D. Variation at the TNF-alpha promoter region associated with susceptibility to cerebral malaria. EN: Nature 1994; 371:508-511.
- MEDEIROS M, PEIXOTO J, OLIVEIRA A.C, CARDILO L, KOATZ V, KAER L, PREVIATO J, MENDONCA L, NOBREGA A, BELLIO M. Toll-like receptor 4(TLR4) dependent proinflammatory and immunomodulatory properties of the glycoinositolphospholipid(GIPL) from *Trypanosoma cruzi*. EN: Journal of leukocyte biology.2007; 82:1-9.
- MENEZES CA, ROCHA MO, SOUZA PE, CHAVES AC, GOLLOB KJ, DUTRA WO. Phenotypic and functional characteristics of CD28C and CD28K cells from chagasic patients: distinct repertoire and cytokine expression. EN: Clin Exp Immunol. 2004; 137: 129-138.
- MICHAILOWSKI V, SILVA NM, ROCHA CD, VIEIRA LQ, LANNES-VIEIRA J, GAZZINELLI RT. Pivotal role of interleukin-12 and interferon- γ axis in controlling tissue parasitism and inflammation in the heart and central nervous system during *Trypanosoma cruzi* infection. EN: Am J Pathol. 2001; 159(5):1723-1733.
- MILLER SA, DYKES DD, POLESKY HF: A simple salting out procedure for extracting DNA from human nucleated cells. EN: Nucleic Acids Res 16:1215, 1988.
- MIRA J, CARIOU A, GRALL F, DELCLAUX C, LOSSER M, HESHMATI F, *et al*. Association of TNF2, a TNF-alpha promoter polymorphism, with septic shock susceptibility and mortality: a multicenter study. JAMA. 1999; 282:561-8.
- MITSUYASU H, IZUHARA K, MAO XQ, GAO PS, ARINOBU Y, ENOMOTO T, KAWAI M, SASAKI S, DAKE Y, HAMASAKI N, SHIRAKAWA T, HOPKIN JM: Ile50Val variant of IL4R alpha upregulates IgE synthesis and associates with atopic asthma. EN: Nat Genet 1998; 19:119-120.

- MOCKENHAUPT FP, HAMANN L, VON GAERTNER C, BEDU-ADDU G, VON KLEINSORGEN C, SCHUMANN RR, BIENZLE U. Common polymorphisms of toll-like receptors 4 and 9 are associated with the clinical manifestation of malaria during pregnancy. EN: J. Infect. Dis. 2006; 194 (2):184-188.
- MOLLAKI V, GEORGIADIS T, TASSIDOU A, IOANNOU M, DANIIL Z, KOUTSOKERA A, PAPATHANASSIOU AA, ZINTZARAS E, VASSILOPOULOS G. Polymorphisms and haplotypes in TLR9 and MYD88 are associated with the development of Hodgkin's lymphoma: a candidate-gene association study. EN: J Hum Genet. 2009; 54(11):655-659
- MONCAYO, A. Chagas disease: current epidemiological trends after the interruption of vectorial and transfusional transmission in the Southern Cone countries. En: Mem. Inst. Oswaldo Cruz. 2003; Vol. 98:577 - 591.
- MONCAYO A, SILVEIRA A. Current epidemiological trends for Chagas disease in Latin America and future challenges in epidemiology, surveillance and health policy. EN: *Mem Inst Oswaldo Cruz*, Rio de Janeiro, 2009, Vol. 104(Suppl. I): 17-30.
- MORENO O, GONZALEZ CI, SAAIBI DL, OTERO W, BADILLO R, MARTIN J, RAMIREZ G: Polymorphisms in the IL4 and IL4RA genes in Colombian patients with rheumatoid arthritis. EN: J Rheumatol, 2007; 34:36-42.
- MORITA C, HORIUCHI T, TSUKAMOTO H, HATTA N, KIKUCHI Y, ARINOBU Y, OTSUKA T, SAWABE T, HARASHIMA S, NAGASAWA K, NIHO Y. Association of tumor necrosis factor receptor type II polymorphism 196R with Systemic lupus erythematosus in the Japanese: molecular and functional analysis. EN: Arthritis Rheum 2001; 44(12):2819-2827.
- MURPHY KM, REINER SL: The lineage decisions of helper T cells. EN: Nat Rev Immunol, 2002; 2:933-944..
- NAKASHIMA H, MIYAKE K, INOUE Y, SHIMIZU S, AKAHOSHI M, TANAKA Y, OTSUKA T, HARADA M: Association between IL-4 genotype and IL-4 production in the Japanese population. EN: Genes Immun 2002; 3:107-109.

- NEDOSPASOV SA, UDALOVA IA, KUPRASH DV, TURETSKAYA RL. DNA sequence polymorphism at the human tumor necrosis factor (TNF) locus. Numerous TNF/lymphotoxin alleles tagged by two closely linked microsatellites in the upstream region of the lymphotoxin (TNF-beta) gene. EN: J Immunol 1991; 147:1053-1059.
- NEGORO K, KINOCHI Y, HIWATASHI N, TAKAHASHI S, TAKAGI S, SATOH J, SHIMOSEGAWA T, TOYOTA T. Crohn's disease is associated with novel polymorphisms in the 5' flanking region of the tumour necrosis factor gene. EN: Gastroenterology. 1999; 117:1062-1068.
- NELMS K, KEEGAN AD, ZAMORANO J, RYAN JJ, PAUL WE: The IL-4 receptor: signaling mechanisms and biologic functions. EN: Annu Rev Immunol. 1999 17:701-738.
- NETEA M, VAN DER GRAAF, C., VAN DER MEER, J., KULLBERG, B. Toll like receptors and the host defence against microbial pathogens: bringing specificity to the immune system, EN: J. leukoc. Biol. 2004; 75, 749-755..
- NEI, M. Molecular evolutionary genetics. EN: Columbia University Press, New York. 1987.
- NG MT, VAN'T HOF R, CROCKETT JC, HOPE ME, BERRY S, THOMSON J, MCLEAN MH, MCCOLL KE, EL-OMAR EM, HOLD GL. Increase in NF-kappaB binding affinity of the variant C allele of the toll-like receptor 9 -1237T/C polymorphism is associated with Helicobacter pylori-induced gastric disease. EN: Infect Immun. 2010; 78(3):1345-1352.
- NIRO G, FONTANA R, GIOFREDA D, et al. Tumor necrosis factor gene polymorphism and clearance or progression of hepatitis B virus infection. EN: Liver Int. 2005; 25: 1175-81.
- NIETO A, BERAÚN Y, COLLADO MD, CABALLERO A, ALONSO A, GONZÁLEZ A, MARTIN J. HLA haplotypes are associated with differential susceptibility to *T. cruzi* infection. EN: Tissue Antigens 2000; 55:195-198.

- NOEL M., RAES G., HASSANZADEH GHASS G, DE BAETSELIER P., BESCHIN A, Alternatively activated macrophages during parasite infections. EN:Trends Parasitol.2004;20: 126-133.
- NOVAK N, KRUSE S, KRAFT S, GEIGER E, KLUKEN H, FIMMERS R, DEICHMANN KA, BIEBER T: Dichotomic nature of atopic dermatitis reflected by combined analysis of monocyte immunophenotyping and single nucleotide polymorphisms of the interleukin-4/interleukin-13 receptor gene: the dichotomy of extrinsic and intrinsic atopic dermatitis. EN: J Invest Dermatol 2002, 119:870-875.
- NOVAK, N., YU, C.F., BUSSMANN, C., MAINTZ, L., PENG, W.M., HART, J., HAGEMANN, T., DIAZ-LACAVA, A., BAURECHT, H.J., KLOPP, N, *et al.* Putative association of a TLR9 promoter polymorphism with atopic eczema. EN: Allergy 2007. 62:766-772.
- OLIVEIRA, A.C.; PEIXOTO, J.R.; DE ARRUDA, L.B. ET AL. - Expression of functional TLR4 confers proinflammatory responsiveness to *Trypanosoma cruzi* glycoinositolphospholipids and higher resistance to infection with *T. cruzi*. EN: J.Immunol.2004; 173: 5688-5696.
- OGUS AC, YOLDAS B, OZDEMIR T, UGUZ A, OLCEN S, KESER I, COSKUN M, CILLI A, YEGIN O. The Arg753Gln polymorphism of the human Toll-like receptor 2 gene in tuberculosis disease. EN: Eur Resp J 2004; 23(2): 219-223.
- OPS- OMS. Tratamiento etiológico de la Enfermedad de Chagas. EN:Conclusiones de una consulta técnica, OPS/hcp/hct/140/99.
- PERAL B, SAN MILLÁN JL, CASTELLO R, *et al.* The Methionine 196 Arginine Polymorphism in Exon 6 of the TNF Receptor 2 Gene (TNFRSF1B) Is Associated with the Polycystic Ovary Syndrome and Hyperandrogenism. EN: The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism. 2002; Vol. 87, No. 8: 3977-3983
- PHILLIPS, C, SALAS, A., SÁNCHEZ, J.J., FONDEVILA, M., GÓMEZ-TATO, A., ÁLVAREZ-DIOS, J., CALAZA, M., CASARES de CAL, M., BALLARD, D., LAREU, M.V., CARRACEDO, Á. Inferring ancestral origin using a single

multiplex assay of ancestry-informative marker SNP's. EN: Forensic. Sci. Int. Gen. 2007; 1: 273-280.

- PINTO JC, Primer Taller Internacional sobre Control de la Enfermedad de Chagas, João Belo Horizonte, 2005.
- PRITCHARD MA, BAKER E, WHITMORE SA, SUTHERLAND GR, IDZERDA RL, PARK LS, COSMAN D, JENKINS NA, GILBERT DJ, COPELAND NG, .: The interleukin-4 receptor gene (IL4R) maps to 16p11.2-16p12.1 in human and to the distal region of mouse chromosome 7. EN: Genomics 1991; 10:801-806.
- PRATA, A. Clinical and epidemiological aspects of Chagas disease. EN: Lancet Infect. Dis. 2001; 1: 92 - 100.
- PUNUKOLLU, GOPIKRISHNA *et al*. Clinical aspects of the Chagas' heart disease. Int. EN: J. Cardiol.2007, Vol. 115; p. 279 - 283.
- PUNNONEN J, YSSEL H, DE VRIES JE: The relative contribution of IL-4 and IL-13 to human IgE synthesis induced by activated CD4+ or CD8+ T cells. J Allergy Clin Immunol 1997; 100: 792-801.
- QU Y, TANG Y, CAO D, LIU J, et al. Genetic polymorphism in alveolar macrophage response-related genes, and risk of silicosis and pulmonary tuberculosis in Chinese iron miners. EN: Int J Hyg Environ health,. 2007; 210: 679-89.
- QUANQUIN NM, GALAVIZ C, FOUTS DL et al. Inmunización of mice with a Tol A-like surface protein of Trypanosoma cruzi generates CD4+ T-cell- dependent parasitocidal activity. EN: Infect Immun. 1999; 67:4603-12.
- OUAISSI A, GUILVARD E, DELNESTE Y, CARON G, MAGISTRELLI G, HERBAULT N, Thieblemont N, Jeannin P: The Trypanosoma cruzi Tc52-released protein induces human dendritic cell maturation, signals via Toll-like receptor 2, and confers protection against lethal infection. EN: J Immunol 2002, 168:6366-6374.
- RACHMILEWITZ D, KATAKURA K, KARMELI F, HAYASHI T, REINUS C, RUDENSKY B et al. Toll-like receptor 9 signaling mediates the anti-

inflammatory effects of probiotics in murine experimental colitis. EN: Gastroenterology 2004; 126:520-528.

- RAMASAWMY, RAJENDRANATH *et al.* The monocyte chemoattractant protein-1 gene polymorphism is associated with cardiomyopathy in human chagas disease. EN: Clin. Infect. Dis. 2006, Vol. 43; p. 305 - 311.
- RAMASAWMY R, CUNHA-NETO E, FAE KC, BORBA SC, TEIXEIRA PC, FERREIRA SC, GOLDBERG AC, IANNI B, MADY C, KALIL J. Heterozygosity for the S180L variant of MAL/TIRAP, a gene expressing an adaptor protein in the Toll-like receptor pathway, is associated with lower risk of developing chronic Chagas cardiomyopathy. EN: J Infect Dis. 2009; 199(12):1838-1845.
- RAMASAWMY R, CUNHA-NETO E, FAE KC, MULLER NG, CAVALCANTI VL, DRIGO SA, IANNI B, MADY C, KALIL J, GOLDBERG AC. BAT1, a putative anti-inflammatory gene, is associated with chronic Chagas cardiomyopathy. EN: J Infect Dis. 2006b; 193: 1394-1399.
- RAMASAWMY R, FAE KC, CUNHA-NETO E, BORBA SC, IANNI B, MADY C, GOLDBERG AC, KALIL J. Variants in the promoter region of IKBL/NFKBIL1 gene may mark susceptibility to the development of chronic Chagas' cardiomyopathy among *Trypanosoma cruzi*-infected individuals. Mol Immunol 2008;45: 283-288.
- RAMASAWMY R, FAE KC, CUNHA-NETO E, MULLER NG, CAVALCANTI VL, FERREIRA RC, DRIGO SA, IANNI B, MADY C, GOLDBERG AC, KALIL J 2007. Polymorphisms in the gene for lymphotoxin-a predispose to chronic Chagas cardiomyopathy. J Infect Dis, 2007; 196: 1836-1843.
- RASSI A JR, RASSI A, RASSI SG. Predictors of mortality in chronic Chagas disease: a systematic review of observational studies. EN: Circulation 2007 115: 1101-1108.
- REIS DD, JONES EM, TOSTES S JR, LOPES ER, GAZZINELLI G, COLLEY DG, MCCURLEY TL: Characterization of inflammatory infiltrates in chronic chagasic myocardial lesions: presence of tumor necrosis factor-alpha+ cells

- and dominance of granzyme A+, CD8+ lymphocytes. EN: Am J Trop Med Hyg 48:637-644, 1993.
- REYNOLDS, J., WEIR, B.S., COCKERHAM, C.C. Estimation for the coancestry coefficient: basis for a shortterm genetic distance. EN: Genetics.1987; 105: 767-779.
 - RIBEIRÃO M, PEREIRA-CHIOCCOLA VL, RENIA L, AUGUSTO FRAGATA FILHO A, SCHENKMAN S, RODRIGUES MM 2000. Chagasic patients develop a type 1 immune response to *Trypanosoma cruzi* trans-sialidase. EN: Parasite Immunol 22: 49-53.
 - ROCHA MO, TEIXEIRA MM, RIBEIRO AL. An update on the management of Chagas cardiomyopathy. EN: Expert Rev Anti Infect Ther. 2007; 5: 727-743.
 - RODRÍGUEZ-PÉREZ, JOSÉ MANUEL *et al*. Tumor necrosis factor-alpha promoter polymorphism in Mexican patients with Chagas' disease. En: Immunol. Lett. 2005 Vol.98; p. 97 – 102.
 - ROSENBERG, N.A., LI, M.L., WARD, R., PRITCHARD, J.K. Informativeness of Genetics Markers for Inference of Ancestry. EN: Am. J. Hum. Genet 2003; 73: 1402-1422.
 - ROSENWASSER LJ, KLEMM DJ, DRESBACK JK, INAMURA H, MASCALI JJ, KLINNERT M, BORISH L: Promoter polymorphisms in the chromosome 5 gene cluster in asthma and atopy. EN: Clin Exp Allergy.1995; 25 Suppl 2:74-78.
 - ROY S, MCGUIRE W, MASCIE-TAYLOR CG, SASHA B, HAZRA SK, HILL AV, KWIATKOWSKI D. Tumor necrosis factor polymorphism and susceptibility to lepromatous leprosy, J Infect Dis. 1997; 176:530-532.
 - SABINO W, VILLA-VERDE D, MENDES-DA-CRUZ D, SILVA-MONTEIRO E, PEREZ A, AOKI M, BOTTASSO O, GUIÑAZU N, SILVA –BARBOSA S, GEA S. Cytokines and cell adhesion receptors in the regulation of immunity to *Trypanosoma cruzi*. EN: Citokine & Growth Factor Reviews. 2007; 18:107-124.
 - SAM-AGUDU NA, GREENE JA, OPOKA RO, KAZURA JW, BOIVIN MJ, ZIMMERMAN PA, RIEDESEL MA, BERGEMANN TL, SCHIMMENTI LA, JOHN

- CC. TLR9 polymorphisms are associated with altered IFN-gamma levels in children with Cerebral Malaria. EN: Am J Trop Med Hyg. 2010; 82(4):548-555
- SANDOVAL C, GUTIERREZ R, LUNA S, AMAYA M, ESTEBAN L, ARIZA H, ANGULO VM. High density of *Rhodnius prolixus* in a rural house in Colombia. TRANSACTIONS OF THE ROYAL SOCIETY OF TROPICAL MEDICINE AND HYGIENE. 2000, 94,372-373.
 - SLATKIN, M. A measure of population subdivision based on microsatellite allele frequencies. En: Genetics. 1995; 139: 457-462.
 - SATO, S. *et al*. A variety of microbial components induce tolerance to lipopolysaccharide by differentially affecting MyD88-dependent and independent pathways. Int. Immunol.2002; 14, 783–791.
 - SCHMAUSSER B, ANDRULIS M, ENDRICH S, LEE SK, JOSENHANS C, MÜLLER-HERMELINK HK, ECK M. Expression and subcellular distribution of toll-like receptors TLR4, TLR5 and TLR9 on the gastric epithelium in *Helicobacter pylori* infection. EN: Clin Exp Immunol. 2004;136 (3):521-526.
 - SCHOFIELD, C.J.; JANNIN, J. & SALVATELLA, R. The future of Chagas disease control. Trends Parasit. 2006, 22: 583-588.
 - SHERRY ST, WARD M, SIROTKIN K. dbSNPs-database for single nucleotide polymorphism and aather classes of minor genetic variation. EN: Genome RES 1999, 9: 677-679.
 - SHERRY ST, WARD MH, KHOLODOV M, et al. dbSNP: the NCBI database of genetic variation. EN: Nucleic Acids Res. 2001; 2 9: 308-311.
 - SILVA JS, VESPA GNR, CARDOSO MAG, ALIBERTI JC, CUNHA FQ. Tumor necrosis factor alpha mediates resistance to *Trypanosoma cruzi* in mice by inducing nitric oxide production in infected INF-γ activated macrophages. EN: Infect Immun. 1995; 63:4862-4867.
 - SOSA-ESTANI S, SEGURA EL. Etiological treatment in patients infected by *T. cruzi*: experiences in Argentina. EN: Curr Opin Infect Dis. 2006; 19: 583-587.

- SOUZA PE, ROCHA MO, ROCHA-VIEIRA E, MENEZES CA, CHAVES AC, GOLLOB KJ, DUTRA WO. Monocytes from patients with indeterminate and cardiac forms of Chagas' disease display distinct phenotypic and functional characteristics associated with morbidity. *Infect Immun*. 2004; 72: 5283-5291.
- SOUZA PE, ROCHA MO, MENEZES CA, COELHO JS, CHAVES AC, GOLLOB KJ, DUTRA WO. *T. cruzi* infection induces differential modulation of costimulatory molecules and cytokines by monocytes and T cells from patients with indeterminate and cardiac Chagas' disease. *Infect Immun*. 2007; 75: 1886-1894.
- SPIES T, MORTON CC, NEDOSPASOV SA, ET AL. Genes for the tumor necrosis factors alpha and beta are linked to the human major histocompatibility complex . *EN: Proc Natk Acad Sci USA*. 1986; 83: 8699-704.
- STORINO R., BEIGELMAN R., MILEI J., FERRANS V. Enfermedad de Chagas: Evidencia de engrosamiento de la membrana basal (¿antilaminina?) en miocitos y capilares miocárdicos con microscopio electrónico. EN: *Rev. Argent. Cardiol*. 1990; 58: 135-142.
- STRIETER RM, BELPERIO JA et al. Cytokines in innate host defence in the lung. *EN. Clin invest*. 2002; 109: 699-705.
- SULLIVAN KE, PILIERO LM, GOLDMAN D, PETRI MA. A TNFR2 3'flanking region polymorphism in sytemic lupus erithematosus. EN: *Genes Immun*. 2000; 1:225-227
- SUN S, BEARD C, JAENISCH R, JONES P, SPRENT J. Mitogenicity of DNA from different organisms for murine B cells. EN: *J Immunol*. 1997; 159:3119-3125.
- TALVANI A, ROCHA MO, BARCELOS LS, GOMES YM, RIBEIRO AL, TEIXEIRA MM: Elevated concentrations of CCL2 and tumor necrosis factor-alpha in chagasic cardiomyopathy. EN: *Clin Infect Dis*. 2004; 38:943-950.
- TANG, GJ,HUANGSL YIEN HW, et al.Tumor necrosis factor gene polymorphism and septic shock in surgical infection. EN: *Crit Care med*. 2000; 28. 2733-2736.

- TARLETON R. Immune system recognition of Trypanosoma cruzi. EN: current opinión in immunology. 2007;19: 430-434.
- TAKEDA K, KAISHO T, AKIRA S. Toll-like receptors. EN: Annu Rev immunol. 2003: 21: 335-376.
- TAO K, FUJII M, TSUKUMO S, MAEKAWA Y, KISHIHARA K, KIMOTO Y, HORIUCHI T, HISAEDA H, AKIRA S, KAGAMI S, YASUTOMO K. Genetic variations of Toll-like receptor 9 predispose to systemic lupus erythematosus in Japanese population. EN: Ann Rheum Dis. 2007; 66(7):905-909.
- THE INTERNATIONAL HAPMAP CONSORTIUM. The International HapMap Project. EN: Nature 2003; 426:789-96.
- THOMAS DC, HAILE RW, DUGGAN D. Recent developments in genomewide association scans: a workshop summary and review. EN: Am J Hum Genet 2005; 77: 337-45.
- TOLUSSO B, FABRI M, COPORALI R, WOMO G, ISOLA M, ET AL., -238 and +489 tnfr- α along with systemic sclerosis. Immunology . LETTERS, 2005; 96: 103-108.
- TORRES OA, CALZADA JE, BERAUN Y, MORILLO CA, GONZALEZ CI, GONZALEZ A, MARTIN J: Association of the macrophage migration inhibitory factor -173G/C polymorphism with Chagas disease. EN: Hum Immunol. 2009; 70: 543-546.
- TORRES O, CALZADA J, et al. Association of the macrophage migration inhibitory factor-173G7C polymorphism with Chagas disease. EN:Hum Immunol.2009 July;70(7), 543-546.
- TORRES O, CALZADA JE, BERAUN Y et al. Role of the IFNG +874T/A polymorphism in Chagas disease in a Colombian population. EN:Infect Genet evol. 2010 Mar 30.
- TRACEY KJ. Tumor necrosis factor-alpha. En: Thomson A. The cytokine handbook, Ed. 2ª, San Diego C. A, EN: Academic Press; 1994, pp. 289-300.

- TRUYENS, C.; TORRICO, F.; LUCAS, R. et al. - The endogenous balance of soluble tumor necrosis factor receptors and tumor necrosis factor modulates cachexia and mortality in mice acutely infected with *Trypanosoma cruzi*. EN: Infect. Immun., 1999; 67: 5579-5586.
- VAN DER GRAF C, KULLBERG BJ, JOOSTEN L et al Functional consequences of the Asp299Gly Toll-like receptors-4 polymorphism. EN: Cytokine. 2005: 30: 264 -268.
- VAN KRUGTEN MV, HUIZINGA TWJ, KAIJZEL EL et al. Association of the TNF+489 polymorphism with susceptibility and radiographic damage in rheumatoid arthritis. EN: Genes and Immunity .1999; 1:91-96.
- VARGAS-ALARCÓN G, ZAMORA J, SÁNCHEZ-GARCÍA S, RODRÍGUEZ-PÉREZ JM, CARDOSO G, POSADAS-ROMERO C. Angiotensin-I-converting enzyme (ACE) insertion/deletion polymorphism in Mexican patients with coronary artery disease. Association with the disease but not with lipid levels. Experimental and molecular pathology 2006;81(2):131-5.
- VITELLI-AVELAR DM, SATHLER-AVELAR R, MASSARA RL, BORGES JD, LAGE PS, LANA M, TEIXEIRA-CARVALHO A, DIAS JC, ELÓI-SANTOS SM, MARTINS-FILHO OA. Are increased frequency of macrophage- like and natural killer (NK) cells, together with high levels of NKT and CD4+CD25high T cells balancing activated CD8+ T cells, the key to control Chagas' disease morbidity? EN: Clin Exp Immunol. 2006; 145: 81-92.
- WALDRON-LYNCH F, ADAMS C, AMOS C, ZHU DK, MCDERMOTT MF, SHAHAN F, MOLLY MG, O'GARA F. Tumour Necrosis Factor 5'promoter single nucleotide polymorphisms influence susceptibility to reumathoid arthritis (RA) in immunogenetically defined multiplex RA familias. EN: Genes Inmmun. 2001; 2:82-87.
- WASCHKE KA, VILLANI AC, VERMEIRE S, DUFRESNE L, CHEN TC, BITTON A, COHEN A, THOMSON AB, WILD GE. Tumor necrosis factor receptor gene polymorphisms in Crohn's disease: association with clinical phenotypes. EN:Am J Gastroenterol. 2005; 100(5):1126-1133.

- WEIR, B. S. Genetic Data Analysis II: Methods for Discrete Population Genetic Data. Sinauer Assoc.1996; Inc., Sunderland, MA, USA.
- WILSON AG, DE VRIES N, POCIOT F, DI GIOVINE FS, VAN DER PUTTE LB, DUFF Chagas Disease Control. An allelic polymorphism within the human tumor necrosis factor alpha promoter region is strongly associated with HLA-A1, B8 and DR3 alleles. EN: J Exp Med 1993; 177:557-560.
- WILSON AG, SYMONS JA, MCDOWELL TL, MC DEVITT HO, DUFF GW. Effects of polymorphism in the human tumor necrosis factor alpha promoter on transcripcional activation. EN: Proc Natl Acad Sci USA. 1997; 94:3195-3199.
- WHO/TDR - World Health Organization. EN: Report of the Scientific Working Group on Chagas disease, Buenos Aires; 2006: p. 7.
- WHO - World Health Organization. *Control of Chagas disease*. Second report of the WHO Expert Committee. EN: Technical Report Series No. 905, Geneva, 2002; p96.
- WHO - World Health Organization. EN: Document EB 124/17, January 2009. Available from: www.who.int.
- WHO - WORLD HEALTH ORGANIZATION. Report of the Expert Committee on the control of Chagas' disease.. EN: WHO Technical Report Series. Ref Type: Report.2007; 905, 11-1.
- ZAFRA G, MORILLO C, MARTIN J., *et al*. Polymorphism in the 3' UTR of the IL12B gene is associated with Chagas' disease cardiomyopathy. En: Microbes Infect. Vol. 9 (2007a); p. 1049- 1052.
- ZAFRA G, FLÓREZ O, MORILLO C, ECHEVERRÍA LE, MARTÍN J, GONZÁLEZ CI. Polymorphisms in Toll-Like receptors 2 and 4 genes in Chagas disease. EN: Mem Inst Oswaldo Cruz 2008; 103(1):27-30.
- ZAFRA G, MORILLO C, GONZÁLEZ CI. Polimorfismos en el gen de TNFa en pacientes infectados con *Trypanosoma cruzi*. EN: Biomédica 2005; 25:130-131.

ANEXOS

Anexo A. Declaratoria de consentimiento informado

Asociación de polimorfismos de genes de inmunidad innata y Enfermedad de Chagas

El Grupo de Inmunología y Epidemiología Molecular de la Universidad Industrial de Santander, está adelantando una línea de investigación relacionada con las defensas del organismo, la cual busca obtener nueva información sobre factores que puedan predisponer al desarrollo de algunas enfermedades, entre ellas la enfermedad de Chagas.

Para tal fin a personas que han vivido por más de 10 años en áreas donde se presente la enfermedad, se les tomarán muestras de sangre para saber si se infectó con el parásito llamado *Trypanosoma cruzi*, el cual causa la enfermedad, y un cultivo para saber si aún circula en su sangre. Adicionalmente a estas muestras se les determinarán las características celulares que puedan estar facilitando la infección por el parásito. Los datos reunidos, proveerán una oportunidad única para responder algunas preguntas sobre la genética de la enfermedad de Chagas.

Esta investigación está catalogada como de riesgo mínimo y genera solo una mínima molestia a los pacientes, representada en la toma de 20 mL de sangre. Usted podría presentar dolor o un hematoma en el sitio de la extracción.

Confidencialidad

Guardaremos privacidad acerca de los registros que puedan identificarlo a usted hasta donde nos lo permita la ley. Ni sus registros ni sus muestras serán marcados con su nombre. Se utilizará un código del estudio. Los investigadores

que participen en este estudio podrán ver ese código pero no su nombre. Su nombre tampoco aparecerá en ningún informe de este estudio.

Autorización para guardar muestras

Una vez procesadas sus muestras de sangre, nos gustaría poderlas guardar en un Banco de sueros y de ADN en el laboratorio del Grupo de Inmunología y Epidemiología Molecular de la Facultad de Salud de la Universidad Industrial de Santander. Estas muestras se podrán utilizar para futuros estudios encaminados a mejorar el conocimiento sobre la Enfermedad de Chagas y otras patologías o estudios de poblaciones. Estos nuevos estudios estarán sujetos a su vez a la aprobación por parte de un comité de ética. Ninguna de estas muestras se someterá a ningún tipo de manipulación genética. Por favor, pregúntenos lo que no entienda acerca de esto. Si firma a continuación, significa que está de acuerdo con dejar guardar las muestras después del estudio.

Si usted no está de acuerdo con dejar guardar estas muestras después del estudio, no firme a continuación. En ese caso podrá participar en el estudio, pero sus muestras serán descartadas después de ser analizadas. En cualquier momento usted podrá exigir que se retiren sus muestras del estudio.

Nombre: _____ Firma: _____

Si firma a continuación significa que ha recibido información completa sobre la naturaleza de la investigación, los riesgos que puede tener al participar y que los investigadores respondieron a todas las inquietudes que formuló. Este estudio no generará costos a los participantes. En constancia,

_____	_____	_____	_____
Nombre del paciente	C.C.	Firma	Fecha
Dirección de residencia	_____		Teléfono _____

Nombre del testigo	C.C.	Firma	Fecha
Dirección de residencia _____		Teléfono _____	

Nombre del testigo	C.C.	Firma	Fecha
Dirección de residencia _____		Teléfono _____	

INVESTIGADOR / COINVESTIGADOR O PERSONA QUIEN TOMA EL
CONSENTIMIENTO INFORMADO

Yo confirmo que personalmente expliqué la naturaleza y el propósito del presente consentimiento, y por tanto certifico que la persona que firma este consentimiento entiende la naturaleza, beneficios y riesgos de participar en este estudio y que su firma es válida. Ningún problema médico o barrera de lenguaje o educación se ha interpuesto en el entendimiento de este documento.

Nombre	Firma	Fecha
--------	-------	-------

Anexo B. Condiciones de PCR:

Condiciones PCR del polimorfismo -1031 del gen *TNFA*

Paso	Temperatura	Tiempo	Ciclos
1	96°C	12:00 min	1
2	94°C	00:30 seg	35
3	59°C	1:00 min	
4	72°C	2:00 min	
5	Volver al paso 2 por 35 tiempos.		
6	72°	2:00 min	1
7	8°	Por siempre	1
8	Fin		

Condiciones PCR del polimorfismo -308 del gen *TNFA*

Paso	Temperatura	Tiempo	Ciclos
1	94°C	1:00 min	1
2	94°C	00:30 seg	30
3	57°C	00:35 seg	
4	65°C	1:00 min	
5	Volver al paso 2 por 35 tiempos.		
6	72°	10:00 min	1
7	8°	Por siempre	1
8	Fin		

Condiciones PCR del polimorfismo +196 del gen *TNFRII*

Paso	Temperatura	Tiempo	Ciclos
1	95°C	5:00 min	1
2	95°C	1:00 min	35
3	57°C	1:00 min	
4	72°C	1:00 min	
5	Volver al paso 2 por 35 tiempos.		
6	72°	5:00 min	1
7	8°	Por siempre	1
8	Fin		

Condiciones PCR del polimorfismo -1237 del gen *TLR9*

Paso	Temperatura	Tiempo	Ciclos
1	94°C	10:00 min	1
2	94°C	00:15 seg	35
3	57°C	00:30 seg	
4	65°C	00:45 seg	
5	Volver al paso 2 por 35 tiempos.		
6	72°	10:00 min	1
7	8°	Por siempre	1
8	Fin		

Anexo C. Estructura Poblacional

Con base en las frecuencias alélicas de los SNPs estudiados, se estimó el coeficiente de Wright para medir la estructuración de la población (F_{ST}). Se realizó un Análisis de Varianza Molecular (AMOVA) utilizando los modelos de Reynolds et al. (1983) y Slatkin, (1995) con significancia diferente de cero y evaluada por un “test” de aleatorización (Excoffier et al. 2006) donde se analizó la estructura genética de la población (Weir, 1996) evaluando diferentes hipótesis que implican la agrupación de todos los individuos dentro de una misma unidad genética, como el hecho de agrupar por separado a los individuos pertenecientes a cada fase particular de la enfermedad. Todos los cálculos se realizaron usando los programas del Software ARLEQUÍN versión 3.11 (Excoffier et al. 2006).

El Análisis Molecular de Varianza (AMOVA) mostró, que los individuos asintomáticos y los sintomáticos no presentan diferencias en términos de su estructura poblacional. Los resultados obtenidos están a favor de la poca diferenciación poblacional dada por los SNPs evaluados ($F_{ST}= 0,0070$), esto significa que ambos conjuntos de pacientes se comportan como grupos pertenecientes a una misma unidad genética poblacional. (Tabla 5).

Cuando se separaron en dos grupos los individuos sintomáticos independientes de la fase y los asintomáticos, el análisis de la estructura genética mostró los mismos resultados que cuando se ubicaron ambos conjuntos de pacientes en un solo grupo. Todo lo anterior sugiere que el número total de individuos considerados en el presente estudio se comportan dentro de una unidad reproductiva, es decir no hay estructura genética poblacional.

Según Hartl & Clark (1997), los valores de F_{ST} por debajo de 0,05 son evidencia de poca estructura poblacional que siguen las poblaciones. Lo anterior se podría deber a sucesos históricos recientes que tuvieron influencia en el mantenimiento de las frecuencias alélicas, pese a esto, el grupo de individuos asintomáticos presentó la menor diferenciación genética ($F_{ST}=0.067$) respecto a los sintomáticos, en donde fue ligeramente mayor ($F_{ST}=0.076$).

También el AMOVA exhibió que la mayor proporción de variación, se debió principalmente a los individuos (99,15%). Al comparar cada marcador, los resultados muestran una ligera diferencia del marcador TNF α -1031, el cual presentó un índice de estructura poblacional mayor entre los grupos de asintomáticos con respecto a los sintomáticos ($F_{ST}=0,0014$; $p=0,027$). Todos estos aspectos, permiten le brindan sustento a la hipótesis de poca diferenciación poblacional, entre los individuos asintomáticos respecto de los sintomáticos.