

**MAPEO GENOMICO DE ALTA RESOLUCION EN GENES UBICADOS EN LA
REGION CROMOSOMICA 5q31.1-q33.1 ASOCIADA CON EL DESARROLLO
DE CARDIOMIOPATIA CHAGASICA**

LINDA PATRICIA ROCHA MUÑOZ

**UNIVERSIDAD INDUSTRIAL DE SANTANDER
FACULTAD DE SALUD
DEPARTAMENTO DE CIENCIAS BÁSICAS
MAESTRÍA EN CIENCIAS BÁSICAS BIOMEDICAS
BUCARAMANGA**

2012

**MAPEO GENOMICO DE ALTA RESOLUCION EN GENES UBICADOS EN LA
REGION CROMOSOMICA 5q31.1-q33.1 ASOCIADA CON EL DESARROLLO
DE CARDIOMIOPATIA CHAGASICA**

LINDA PATRICIA ROCHA MUÑOZ

**Trabajo de grado presentado para optar al título de:
MAESTRA EN CIENCIAS BASICAS BIOMEDICAS**

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

**UNIVERSIDAD INDUSTRIAL DE SANTANDER
FACULTAD DE SALUD
DEPARTAMENTO DE CIENCIAS BÁSICAS
MAESTRÍA EN CIENCIAS BÁSICAS BIOMEDICAS
BUCARAMANGA**

2012

DEDICATORIA

A mi hija Mariana

Mi fuente de inspiración, el motor que me me impulsa a seguir adelante y ser cada día mejor.

A mi esposo Wualdimer

Por su cariño, estímulo y apoyo constante, pero sobre todo por su comprensión y paciencia por el tiempo que no compartimos juntos.

A mis padres Luz Marina y Antonio

Por haberme apoyado en todo momento, por sus consejos, sus valores, por la motivación constante que me ha permitido ser una persona de bien, pero más que nada, por su amor.

A mi abuela Ana

Por todo su apoyo y por sus oraciones para que este proyecto culminara satisfactoriamente.

A mi abuelo Antonio

Quien desde el cielo me guía y estoy segura que se sentiría orgulloso de mí.

AGRADECIMIENTOS

A Dios por haberme permitido llegar hasta este punto y haberme dado salud para lograr mis objetivos, además de su infinita bondad y amor.

Mis más sinceros agradecimientos a la Dra. Clara Isabel González por darme la oportunidad de hacer parte de su grupo de Investigación, por su gran apoyo y paciencia para la culminación de este trabajo. Gracias por el buen ejemplo que me dio y por todas sus enseñanzas, que me hicieron ser una mejor persona y por impulsar mi desarrollo profesional.

A mis compañeros de Maestría

Quienes nos apoyamos mutuamente en nuestra formación profesional y que hasta ahora, seguimos siendo amigos: Mayra, Laurentino, Viviana, Juan Guillermo, Rocío.

A mis compañeros de laboratorio

A Martica por todo su apoyo y sus consejos en los momentos difíciles. A Oscar por ser mi mano derecha en la elaboración de este trabajo y por sus valiosas enseñanzas. A Dorita por la amistad que siempre me ha brindado. A la Dra. Carmen Cecilia, por escucharme y ayudarme siempre.

CONTENIDO

| | Pág. |
|---|------|
| INTRODUCCION | 15 |
| ENFERMEDAD DE CHAGAS..... | 17 |
| 1.1 AGENTE ETIOLÓGICO DE LA ENFERMEDAD DE CHAGAS..... | 17 |
| 1.1.1 Ciclo vida de <i>Trypanosoma cruzi</i> | 19 |
| 1.1.2 Vector de <i>Trypanosoma cruzi</i> | 19 |
| 1.2 EPIDEMIOLOGÍA | 20 |
| 1.2.1 Mecanismos de transmisión..... | 22 |
| 1.2.1.1 Vectorial | 23 |
| 1.2.1.2 Transfusional | 23 |
| 1.2.1.3 Congénita..... | 23 |
| 1.2.1.4 Oral | 23 |
| 1.2.1.5 Accidental | 24 |
| 1.3 ASPECTOS CLÍNICOS | 24 |
| 1.3.1 Fase aguda..... | 25 |
| 1.3.2 Fase crónica | 26 |
| 2. INTERACCIÓN DE <i>Trypanosoma cruzi</i> CON EL HOSPEDERO HUMANO | 27 |
| 2.1 ASPECTOS INMUNOLÓGICOS..... | 27 |
| 2.1.1 Inmunidad Innata | 28 |
| 2.1.2 Inmunidad Adaptativa | 29 |
| 3. ASPECTOS GENETICOS | 31 |
| 3.1 CAMK2A | 36 |
| 3.2 IRF1 | 38 |

| | |
|--|----|
| 4. JUSTIFICACION..... | 42 |
| 5. OBJETIVOS..... | 44 |
| 5.1 OBJETIVO GENERAL..... | 44 |
| 5.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS..... | 44 |
| 6. MATERIALES Y METODOS..... | 45 |
| 6.1 POBLACIÓN DE ESTUDIO..... | 45 |
| 6.2 SELECCIÓN DE TagSNPs..... | 46 |
| 6.3 GENOTIPIFICACIÓN DE POLIMORFISMOS..... | 47 |
| 6.4 ANÁLISIS ESTADÍSTICO..... | 49 |
| 6.5 CONSIDERACIONES ETICAS..... | 50 |
| 7. RESULTADOS..... | 51 |
| 7.1 ESTRUCTURA POBLACIONAL..... | 51 |
| 7.2 ANÁLISIS DE ASOCIACIÓN ALÉLICA Y GENOTÍPICA..... | 51 |
| 7.3 ANÁLISIS DE DESEQUILIBRIO DE LIGAMIENTO..... | 53 |
| 8. DISCUSION..... | 55 |
| 9. CONCLUSIONES..... | 62 |
| 10. RECOMENDACIONES..... | 63 |
| BIBLIOGRAFIA..... | 64 |
| ANEXOS..... | 74 |

LISTA DE TABLAS

| | Pág. |
|---|------|
| Tabla 1. Clasificación de los pacientes según grados de severidad de EC | 46 |
| Tabla 2. Características de la población en estudio..... | 51 |
| Tabla 3. Asociación de SNPs con el desarrollo de cardiomiopatía chagásica | 52 |
| Tabla 4. Análisis del desequilibrio de ligamiento..... | 54 |

LISTA FIGURAS

| | Pág. |
|--|------|
| Figura 1. Ciclo de vida de <i>Trypanosoma cruzi</i> | 18 |
| Figura 2. Flujo de migración desde países endémicos para <i>T. cruzi</i> | 21 |
| Figura 3. Mapa de Santander. Incidencia de Chagas por provincias. Año 2006 ... | 22 |
| Figura 4. Evolución clínica de la enfermedad de Chagas | 25 |
| Figura 5. Citoquinas y poblaciones celulares involucradas en la generación de respuesta de protección o patología en la EC. | 27 |
| Figura 6. Estructura de la variación genética..... | 34 |
| Figura 7. Superposición de los factores de riesgo genéticos para enfermedades comunes | 36 |
| Figura 8. Diagrama lineal de α -CAMK2..... | 37 |
| Figura 9. Mapa de DL del gen CAMK2A..... | 38 |
| Figura 10. Estructura lineal de IRF | 40 |
| Figura 11. Mapa de DL del gen <i>IRF1</i> | 40 |
| Figura 12. Ensayo de genotipificación | 48 |
| Figura 13. Asociación de SNPs individuales..... | 52 |
| Figura 14. Asociación de Haplotipos..... | 54 |

LISTA DE ANEXOS

| | pág. |
|---|-------------|
| Anexo A. Declaratoria de consentimiento informado | 74 |

GLOSARIO

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

ASOCIACIÓN GENÉTICA: correlación de un rasgo y un alelo en una población de una manera más frecuente de lo esperado al azar.

DESEQUILIBRIO DE LIGAMIENTO: combinación de alelos en una población que difieren en la frecuencia de la predicha del producto de sus frecuencias individuales en la población.

ESTUDIO DE CASO-CONTROL: estudio epidemiológico, observacional, analítico, en el que los sujetos son seleccionados en función de que tengan (casos) o no tengan (control) una determinada enfermedad, o en general un determinado efecto.

FRECUENCIA ALÉLICA MÍNIMA: frecuencia del alelo menos común de un polimorfismo

GENOTIPO: composición genética de un individuo que se refleja en su secuencia de ADN.

HAPLOTIPO: combinación de alelos en diferentes loci que se heredan en forma conjunta.

LOCUS: ubicación cromosómica de un gen o un marcador

MAPEO GENÉTICO: consiste en el uso de técnicas genéticas para construir un mapa genómico.

ODDS RATIO (OR): medida de riesgo que compara la probabilidad de ocurrencia de una enfermedad en un grupo con un alelo de riesgo, con la probabilidad en un grupo control.

POLIMORFISMO: locus que está representado por un número diferente de alelos o haplotipos en la población.

TAG SNP: SNP que está en fuerte desequilibrio de ligamiento con múltiples SNPs.

RESUMEN

TITULO*: MAPEO GENÓMICO DE ALTA RESOLUCIÓN EN LA REGIÓN 5q31.1-q33.1 ASOCIADO CON EL DESARROLLO DE CARDIOMIOPATÍA CHAGÁSICA.

AUTORES:** ROCHA MUÑOZ, Linda Patricia; GONZÁLEZ RUGELES, Clara Isabel.

PALABRAS CLAVES: Mapeo, región 5q33.1-q33.1, Cardiomiopatía chagásica

DESCRIPCIÓN

La enfermedad de Chagas, causada por la infección por el parásito protozoario intracelular *Trypanosoma cruzi*, continua siendo un problema de salud pública, a pesar del control eficiente del vector transmisor. Cerca de un tercio de los individuos infectados progresan a cardiomiopatía chagásica crónica (CCC), mientras los dos tercios restantes permanecen asintomáticos y esto puede ser atribuible a susceptibilidad genética diferencial.

Objetivo: Identificar grupos de genes asociados con susceptibilidad o resistencia al desarrollo de CCC, mediante un mapeo de alta resolución en la región cromosómica 5q31.1-q33.1.

Materiales y métodos: Estudio poblacional de casos y controles en 400 pacientes chagásicos divididos en 200 pacientes sintomáticos (casos) y 200 pacientes asintomáticos (controles) de zona endémica del departamento de Santander.

Resultados y discusión: El alelo G del SNP rs2070729 del gen *IRF1* se asoció con susceptibilidad a desarrollar CCC, por mayor frecuencia en los pacientes sintomáticos comparado con los asintomáticos, siendo esta diferencia estadísticamente significativa. El haplotipo TGG conformado por los rs2070729, rs17622656, rs9282763 se encontró con mayor frecuencia en los pacientes asintomáticos, sugiriendo que este haplotipo actúa como un factor de protección para el desarrollo de CCC en la población analizada.

El alelo A del SNP rs10066581 del gen *CAMK2A* tuvo una frecuencia mayor en los pacientes con CCC, siendo esta diferencia estadísticamente significativa, con lo cual se sugiere podría estar asociado a susceptibilidad al desarrollo de CCC. Igualmente, el haplotipo CA conformado por los rs3822607 y rs10066581, mostró asociación con susceptibilidad al desarrollo de CCC, por lo tanto podría ser considerado un factor de riesgo para el desarrollo de CCC en la población analizada. El alelo G del SNP rs6882623 en el gen *CAMK2A*, tuvo una frecuencia mayor en los individuos asintomáticos y de igual forma el haplotipo GCTG conformado por los rs6882623, rs2241695, rs10051644, rs6885505 estuvo asociado con protección.

* Proyecto de grado

** Facultad de Salud. Maestría en Ciencias Básicas Biomédicas. Director: Clara Isabel González Rugeles, MSC., PHD.

ABSTRACT

TITLE: HIGH-RESOLUTION GENOMIC MAPPING IN THE REGION 5q31.1-q33.1 ASSOCIATED WITH THE DEVELOPMENT OF CHAGAS CARDIOMYOPATHY .*

AUTORES: ROCHA MUÑOZ, Linda Patricia; GONZÁLEZ RUGELES, Clara Isabel

KEYWORDS: Mapping, chromosome 5q31.1-q33.1, Chronic Chagas Cardiomyopathy

DESCRIPTION

Chagas disease caused by the intracellular protozoan parasite *Trypanosoma cruzi*, is still a major threat to human health in Latin America, despite efficient control of the transmitting vector. Nearly one-third of *T. cruzi*-infected individuals progress to chronic Chagas cardiomyopathy (CCC), whereas the remaining two-thirds remain asymptomatic and may be attributable to differential genetic susceptibility. Genetic susceptibility to development of cardiomyopathy is complex, heterogeneous, and likely involves several genes.

Objective: To identify groups of genes associated with susceptibility or resistance to development of chagasic cardiomyopathy by high-resolution mapping in chromosome 5q31.1-q33.1.

Materials and methods: Our study population consisted of 200 serologically positive cardiomyopathic patients and 200 seropositive and asymptomatic from endemic area of the department of Santander.

Results and discussion: The SNP rs2070729 G allele of *IRF1* gene was associated with susceptibility to develop CCC more frequently in symptomatic patients compared with asymptomatic, and this difference was statistically significant. The TGG haplotype formed by rs2070729, rs17622656, rs9282763 was found more frequently in asymptomatic patients, suggesting that this haplotype acts as a protective factor for the development of CCC in the population analyzed. The rs10066581 SNP allele of the gene *CAMK2A* had a greater frequency in patients with CCC, the difference being statistically significant, which is suggested may be associated with susceptibility to the development of CCC. Furthermore, the haplotype formed by rs3822607 CA and rs10066581, showed association with susceptibility to the development of CCC, may therefore be considered a risk factor for the development of CCC in the population analyzed. The SNP rs6882623 G allele in the gene *CAMK2A*, had a higher frequency in asymptomatic individuals and similarly GCTG haplotype formed by rs6882623, rs2241695, rs10051644, rs6885505 was associated with protection.

* Work Degree

** Faculty of Health. Master of Basic Biomedical Sciences. Director: Clara Isabel González Rugeles, *MSC., PHD.*

INTRODUCCION

La enfermedad de Chagas (EC), conocida también como Tripanosomiasis Americana es causada por la infección con el parásito protozoario intracelular *Trypanosoma cruzi*. Uno de los aspectos importantes de la EC es la gran variación en el desarrollo de la enfermedad, que va en la fase aguda desde la infección asintomática, en la mayoría de los casos, a miocarditis y muerte repentina en una minoría. Y en el caso de la enfermedad crónica, el desarrollo de cardiomiopatía y/o megavísceras, que ocurre aproximadamente en un tercera parte de los individuos infectados.

Los mecanismos responsables de la patogénesis de la EC no están completamente entendidos. La hipótesis más aceptada es que la destrucción del miocardio característica de la mayoría de las formas clínicas de la EC es causada por una reacción inflamatoria progresiva, generada por la presencia del parásito ^[11]. De ahí, la búsqueda de características de la respuesta inmune del hospedero para explicar el establecimiento de las respuestas patológicas o protectoras. Igualmente, la diversidad y grados de severidad de las manifestaciones clínicas, y el hecho que sólo la tercera parte de los infectados evolucione a cardiomiopatía chagásica crónica (CCC) apunta a un componente genético de susceptibilidad involucrado en la patogénesis. ^[27].

Varios estudios han evaluado la ocurrencia de polimorfismos genéticos funcionales, presentes en genes que codifican moléculas relacionadas en el control de la respuesta inmune y la susceptibilidad genética a la CCC ^[14; 70; 92]. De igual forma, el Grupo de Inmunología y Epidemiología Molecular, utilizando estudios de casos y controles encontró asociación de la CCC con citoquinas proinflamatorias como IL1 beta ^[32] e IL12 beta ^[101] y la cadena alfa del receptor de

IL-4 ^[31] y hay dos artículos sometidos de asociaciones con el receptor de quimioquinas CCR5 y TNF-alfa.

La identificación de los genes implicados en enfermedades complejas, como es el caso de la EC, es uno de los grandes desafíos en el campo de la genética humana. Su implementación se ha visto facilitada cada día más, debido a la disponibilidad de bases de datos con mayor información sobre las variantes genéticas en los distintos grupos étnicos, el desarrollo de mejores y más eficaces métodos de genotipificación a gran escala mediante el uso de micromatrices, la selección de polimorfismos de un único nucleótido (SNP) en regiones con desequilibrio de ligamiento (DL), denominados SNPs etiqueta o “tag SNPs” y el diseño de algoritmos bioestadísticos y programas de computación para el manejo de grandes cantidades de datos. Hasta el momento no hay reportes de estudios de mapeo genómico realizados en humanos en relación con la susceptibilidad al desarrollo y severidad de la sintomatología clínica. Hallazgos previos de nuestro grupo, en humanos, sugieren la ubicación de varias regiones cromosómicas asociadas con la susceptibilidad a desarrollar CCC, estas regiones se encuentran en los cromosomas 2 ^[32], 3 (datos en proceso de publicación) y 5 ^[101]. Basados en estos hallazgos en este trabajo de grado se propuso realizar un mapeo de alta resolución de la región cromosómica 5q31.1-q33.1, en la cual se encuentra el gen *IL12B*. Para ello utilizando herramientas bioinformáticas y mapas de alta densidad y DL con acceso público se realizó la selección de “tagSNPs”. En esta región cercanos al gen de *IL12B* mapean genes involucrados en el montaje de respuesta inmune como *CD74*, *TIMD4* *C1QTNF2*, genes de factores de transcripción como *IRF1*, de moléculas de señalización como *ITK*, *CAMK2A*. Los altos niveles de DL ^[59] hacen de esta una región ideal para realizar mapeo fino con “tagSNPs”, con el fin de identificar genes que podrían estar involucrados en el desarrollo de CCC.

1. ENFERMEDAD DE CHAGAS

La enfermedad de Chagas (EC) o Tripanosomiasis Americana es una compleja zoonosis causada por la infección con el parásito protozoario *Trypanosoma cruzi*. La infección humana es transmitida por insectos vectores selváticos o domésticos, de la familia Reduviidae, perteneciente a la subfamilia Triatominae, cuyo hábitat se extiende principalmente en Centro y Suramérica. Sin embargo, debido a las migraciones humanas, actualmente se han presentado casos en países de Norte América, Europa, Asia y Oceanía (Schmunis and Yadon, 2010). La transmisión vectorial es la forma normal de transmisión entre animales y es la más común en el hombre, pero se puede adquirir también mediante transfusión sanguínea o trasplante de órganos de personas infectadas, así como por vía congénita y raramente, por la ingestión de sustancias contaminadas o por infección accidental en el laboratorio.

1.1 AGENTE ETIOLÓGICO DE LA ENFERMEDAD DE CHAGAS

Trypanosoma cruzi es un protozoario flagelado perteneciente al orden Kinetoplastida, familia Trypanosomatidae, género Trypanosoma. Recibió su nombre en homenaje a Oswaldo Cruz.

T. cruzi presenta cuatro formas morfológicas y biológicamente diferentes durante su ciclo de vida (Figura 1):

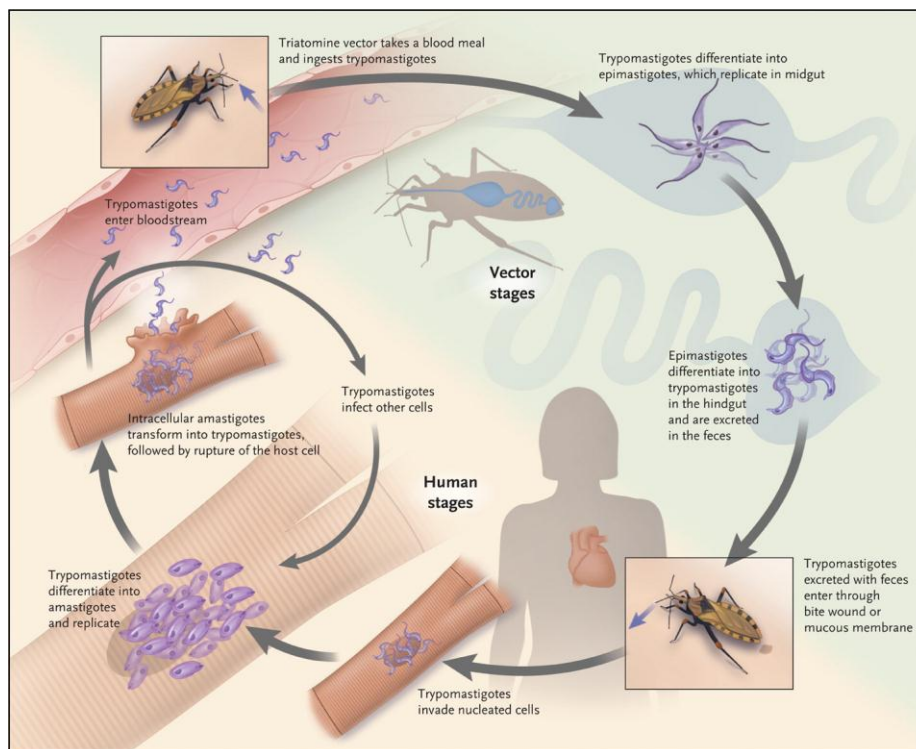
Tripomastigote metacíclico: forma infectante no replicativa, caracterizada por poseer una forma elongada y flagelada. Esta forma se desarrolla en la porción posterior del intestino y recto del insecto vector e inicia la infección en una amplia variedad de hospederos vertebrados.

Amastigote: estadio replicativo, se caracteriza por su forma esférica y aflagelada, se localiza en el interior de las células del hospedero infectado en donde se replica por fisión binaria.

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 triatominio.

Epimastigote: forma replicativa y móvil. Puede ser encontrado en el tubo digestivo del insecto vector. Es la forma predominante en cultivos axénicos.

Figura 1. Ciclo de vida de *Trypanosoma cruzi*



Fuente: Bern *et al.*, 2011

1.1.1 Ciclo vida de *Trypanosoma cruzi*. *T. cruzi* existe en la naturaleza en diferentes poblaciones de hospederos vertebrados tales como animales silvestres, animales domésticos y seres humanos; e invertebrados, como los insectos vectores [2]. Durante la fase en el hospedero invertebrado, éste ingiere las formas tripomastigotes que se encuentran circulantes en la sangre del hospedero infectado. Estas formas migran al intestino medio del insecto donde se transforman en epimastigotes y entonces, en el intestino posterior, se diferencian en tripomastigotes metacíclicos (un proceso conocido como metaciclogénesis) los cuales son eliminados a través de las heces y orina del insecto vector, quienes son capaces de infectar al hospedero vertebrado a través de mucosas o heridas en la piel.

En el hospedero vertebrado, los tripomastigotes metacíclicos invaden los primeros tipos celulares presentes en el tejido, como macrófagos, fibroblastos o células epiteliales. Una vez dentro de la célula hospedera los parásitos se transforman en amastigotes y después de algunos ciclos de multiplicación se transforman de nuevo en tripomastigotes sanguíneos. Estas formas pueden invadir nuevas células localizadas en el sitio de la infección, alcanzar la corriente circulatoria o cualquier tejido del hospedero o bien ser ingeridos por el insecto vector durante la picadura al hospedero, completándose de esta manera el ciclo vital del parásito (Figura 1).

1.1.2 Vector de *Trypanosoma cruzi*. Los vectores implicados en la transmisión de la EC son insectos del orden Hemiptera, familia Reduviidae, pertenecientes a la subfamilia Triatominae. Más de 130 especies silvestres y domiciliarias han sido encontradas como potenciales vectores de *T. cruzi*, pero tres tienen particular importancia epidemiológica en América Latina porque están bien adaptadas a la vivienda humana, como son *Rhodnius prolixus*, *Triatoma dimidiata* y *Triatoma infestans*, siendo los principales vectores de *T. cruzi* en Latinoamérica (Guhl, 2007). En Santander, los vectores más frecuentemente encontrados son *Rhodnius prolixus*, *Triatoma dimidiata* y *Panstrongylus geniculatus* (Guhl, 1999; Sandoval et al., 2000).

1.2 EPIDEMIOLOGÍA

La distribución geográfica de la EC, incluyendo reservorios y vectores, se extiende desde el sur de los Estados Unidos hasta el sur de Argentina y Chile ^[22]. Según la Organización Panamericana de la Salud, 20% de la población latinoamericana está en riesgo de adquirir la enfermedad (109 millones de individuos) y cerca de 7,7 millones de individuos se encuentran infectados ^[64]. Afortunadamente, el éxito en las estrategias de control del vector ha reducido la transmisión de la enfermedad en varios países de América Latina con la reducción en la incidencia de nuevos casos (700.000 por año en 1990 a 41.200 en 2006) y en el número de muertes (alrededor de 45.000 por año 1990 a 12.500 por año en 2006) ^[58].

Por otra parte, como resultado de los movimientos migratorios de zonas rurales a zonas urbanas, han cambiado las características epidemiológicas de la EC. Se estima que alrededor de 70% de la población Latinoamericana vive en áreas urbanas, cuando las cifras en los años 30 mostraban que el 70% habitaba en áreas rurales. Es importante agregar que dicha transmisión no se limita a los países en los que la enfermedad es endémica. Un nuevo problema epidemiológico, económico, social y político se ha creado con la internacionalización de la EC debido a la migración legal e ilegal desde países endémicos de Latinoamérica a países no endémicos en Norte América, Europa, Asia y Oceanía (Figura 2). En estos países no endémicos, la transfusión de sangre, el trasplante de órganos y la transmisión vertical, son la ruta de infección con *T. cruzi*. ^[79].

Figura 2. Flujo de migración desde países endémicos para *T. cruzi*

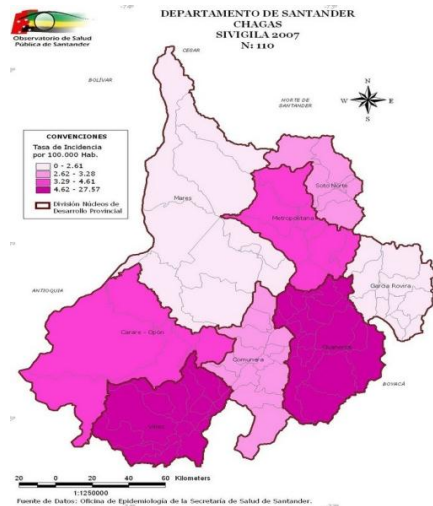


Fuente: Schmunis *et al.* 2010

En Colombia se estima que un 5% de la población que vive en áreas endémicas está infectada lo cual equivale a aproximadamente 700.000 personas y cerca del 20% se encuentra en riesgo de adquirir la infección, considerando la distribución geográfica de los vectores. Los departamentos con las tasas más altas 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%) ^[57].

Estudios realizados en Santander han reportado porcentajes de seropositividad superiores al 40% en algunos municipios de las provincias Comunera y Guanentina (Gutierrez *et al.*, 2004) (Figura 4). 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 3. Mapa de Santander. Incidencia de Chagas por provincias. Año 2006



Fuente: SIVIGILA, 2007.

La estrategia de control de la EC está basada en la interrupción de la transmisión vectorial y en el tamizaje sistemático de la sangre de donadores en todos los países endémicos, en la detección y tratamiento de la transmisión congénita y en la administración de tratamiento a los casos agudos y a los niños. Estas intervenciones han contribuido a la interrupción de la transmisión en amplias regiones del continente. Brasil, Chile y Uruguay, por ejemplo, han sido declarados como países libres de transmisión

1.2.1 Mecanismos de transmisión. Las formas de transmisión de *T. cruzi* reconocidas son las debidas a transmisión vectorial, transfusión de sangre, vía congénita y las que ocurren vía oral, por la ingestión de alimentos contaminados. Mecanismos menos comunes incluyen accidentes de laboratorio, manejo de animales infectados, trasplante de órganos y leche materna. Una vía teóricamente posible, pero extremadamente rara es la transmisión sexual, por contacto con espermatozoides o fluido menstrual contaminado con *T. cruzi* [21].

1.2.1.1 Vectorial: Es actualmente responsable de más del 70% de los casos en países en los cuales no hay un control sistemático del vector. La presencia de la enfermedad en los humanos es un hecho puramente accidental, después de la domiciliación de los vectores, provocada por desequilibrios ambientales.

1.2.1.2 Transfusional: Como *T. cruzi* puede ser detectado en sangre de individuos infectados, o aquellos con falla en el tratamiento, la infección puede ser transmitida a individuos no infectados a través de la transfusión de sangre. La posibilidad de infección por esta vía depende de varios factores, como la presencia de parasitemia en el momento de la donación, volumen de sangre transfundido, estado inmunológico del receptor, prevalencia de la infección por *Trypanosoma cruzi* entre los candidatos a donantes de sangre y calidad de la sangre transfundida. Con excepción del plasma liofilizado y derivados sanguíneos expuestos a procedimientos físico-químicos de esterilización (albúmina, gamaglobulina), todos los componentes sanguíneos son infectantes. Si se mantiene a temperatura ambiente *T. cruzi* permanece viable a 4°C de 18 a 250 días.

1.2.1.3 Congénita: Aunque las tasas de infección congénita pueden variar ampliamente, es aceptado que en los países del cono sur de América de 1 a 12% de los recién nacidos de madres infectadas podrían estar infectados [16; 93]. La principal vía de transmisión vertical es la transplacentaria y puede ocurrir en cualquier fase de la enfermedad materna: aguda, indeterminada o crónica. La transmisión también puede suceder en cualquier momento de la gestación, siendo más probable en el último trimestre, u ocurrir al pasar por el canal del parto, por el contacto de las mucosas del feto con la sangre de la madre infectada.

1.2.1.4 Oral: La transmisión oral, común entre animales en el ciclo silvestre, es esporádica y circunstancial en humanos y ocurre por la ingestión de alimentos

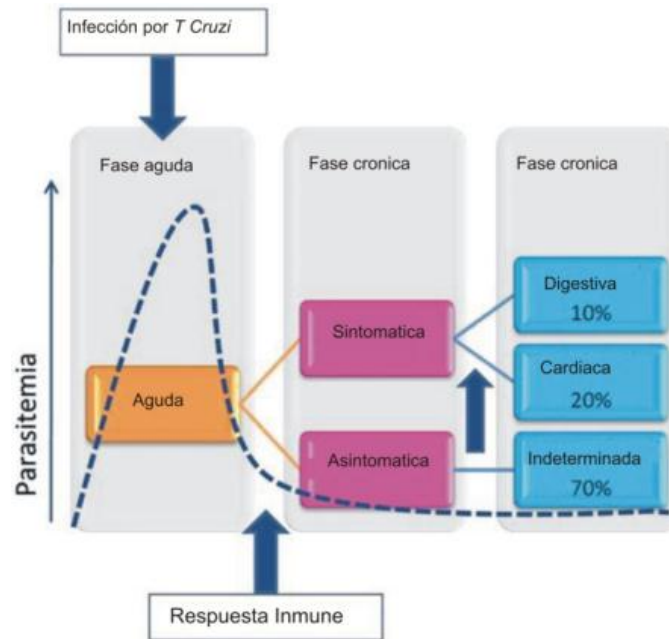
contaminados con las heces de triatominos u ocasionalmente por secreciones de las glándulas de olor de los marsupiales o sangre de animales salvajes. Además, por ingestión de carne mal cocida o sangre de animales salvajes (armadillo) ^[21]. Esta forma de transmisión se está presentado con mayor frecuencia en diferentes países y en nuestra región. Los brotes aparecen de forma súbita, afectando a un pequeño número de personas. Generalmente coinciden con épocas de calor, de mayor actividad de los triatominos (mayor movilidad de vectores, mayor hematofagia, mayor contaminación del ambiente con heces infectadas, mayor producción de casos agudos por la vía vectorial clásica).

1.2.1.5 Accidental: En estos casos, la infección se puede deber al contacto de mucosas o micro lesiones de piel con cultivos de *T. cruzi* durante la manipulación sin el uso adecuado de equipamiento de protección personal de heces infectadas de triatominos o sangre de paciente o animal conteniendo la forma tripomastigote.

1.3 ASPECTOS CLÍNICOS

Uno de los aspectos importantes de EC es la gran variación en el desarrollo de la enfermedad, que va en la fase aguda desde la infección asintomática, en la mayoría de los casos, a miocarditis y muerte repentina en una minoría. Y en el caso de la enfermedad crónica, el desarrollo de cardiomiopatía y/o megavísceras (Figura 5).

Figura 4. Evolución clínica de la enfermedad de Chagas.



Fuente: Modificado de Dutra *et al.*, 2009.

1.3.1 Fase aguda. Posterior a la infección con *T. cruzi* los individuos desarrollan una fase aguda que oscila entre dos y cuatro meses. Esta fase suele ser asintomática pero pueden ocurrir manifestaciones como fiebre, dolor muscular, sudoración, hepatoesplenomegalia, falla cardíaca y menos frecuente, meningoencefalitis. El compromiso cardíaco está presente en aproximadamente el 90% de los casos. Durante esta etapa hay un elevado parasitismo acompañado de una intensa inflamación. El diagnóstico se establece en menos del 10% de los casos, debido probablemente a los síntomas inespecíficos.

Las manifestaciones de la fase aguda se resuelven espontáneamente en la mayoría de los casos en un periodo de pocos meses. La mortalidad ocurre ocasionalmente (5-10% de los casos sintomáticos), como resultado de una severa miocarditis o meningoencefalitis ^[21].

1.3.2 Fase crónica. La progresión a la fase crónica es simultánea con el establecimiento de una eficiente respuesta inmune del hospedero, la mayoría de los pacientes en esta fase son asintomáticos y se clasifican como indeterminados [72]. Este periodo inicia entre 8 y 10 semanas después de la fase aguda y puede persistir durante varios años o indefinidamente. Aunque la mayoría de los pacientes crónicos son asintomáticos, aproximadamente el 30% desarrolla patologías asociadas a tejido cardíaco y/o digestivo.

La forma cardíaca es la manifestación más frecuente de la EC crónica. Las manifestaciones clínicas dependen del grado de daño miocárdico, presentándose arritmias, aneurismas apicales y falla cardíaca. [71; 76].

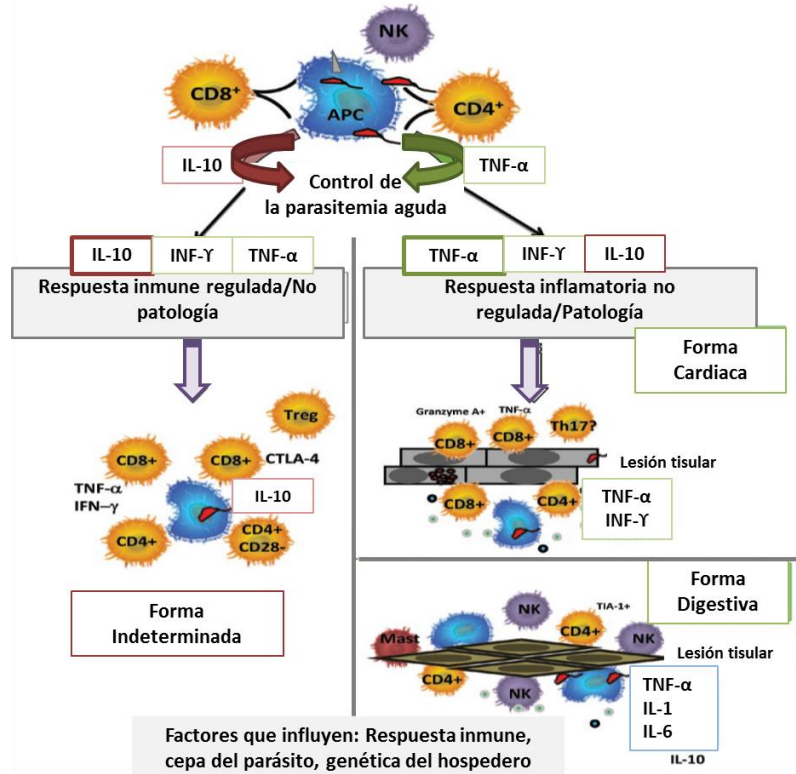
La forma digestiva se desarrolla en cerca del 10-15% de los pacientes infectados como resultado de la destrucción del plexo nervioso mioentérico que se presenta con una variedad de síndromes clínicos, que van desde leve dificultad para deglutir a dilataciones severas de estructuras intestinales conocidas como el síndrome de "mega" de la EC.

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

2.1 ASPECTOS INMUNOLÓGICOS

La recuperación de una infección requiere la generación de una respuesta inmunológica eficiente que pueda eliminar o, por lo menos, controlar el patógeno infectante. Sin embargo, la inducción de la respuesta inmunológica también podría ser responsable del desarrollo de patologías como resultado de la infección pero independientes de la presencia del patógeno. La infección por *T. cruzi* representa un modelo apropiado e interesante para entender el balance entre la respuesta inmune eficiente y la inmunopatología. (Figura 6).

Figura 5. Citoquinas y poblaciones celulares involucradas en la generación de respuesta de protección o patología en la EC.



Fuente: Modificado de Dutra *et al.*, 2009.

2.1.1 Inmunidad Innata. El montaje de la respuesta inmune innata contra *T. cruzi* es crucial para controlar la replicación del parásito y la diseminación durante la fase aguda de la infección y así mismo iniciar la respuesta inmune adaptativa contra este patógeno ^[50]. Varias moléculas de superficie de *T. cruzi* han sido identificadas como inductoras de inmunidad innata, entre ellas se destacan el glicosilfosfatidilinositol (GPI) anclado, glicoproteínas unidas al GPI como la mucina y la enzima trans-sialidasa ^[38]. Estos antígenos de *T. cruzi* son conocidos como patrones moleculares asociados a patógenos o PAMPs y son reconocidos por una clase de receptores de reconocimiento de patrones (PRRs) los cuales son expresados en las células de la inmunidad innata, como células dendríticas, macrófagos y células asesinas naturales (NK). 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 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* ^[78; 90]. La unión de los PAMPs del parásito a los PRRs de las células de la inmunidad innata, estimulan la producción de mediadores proinflamatorios, incluyendo citoquinas como factor de necrosis tumoral alfa (TNF- α), interleuquina-12 (IL-12) e interferón gamma (IFN- γ), quimioquinas y óxido nítrico (ON) ^[19; 88]. Esas interacciones no solo proveen la primera línea de defensa contra la infección por *T.cruzi* sino las señales inflamatorias generadas modulan la respuesta inmune adaptativa.

Aunque las teorías que tratan de explicar los mecanismos que subyacen a la patogénesis de la EC son controversiales, las teorías de autorreactividad y la persistencia del parásito no son mutuamente excluyentes, ambas deben ser consideradas al tratar de entender el origen y la progresión de la enfermedad. Independientemente del origen ó fuente de los antígenos que desencadenan la respuesta inmune durante la infección crónica, existe un consenso de que el

sistema inmune del hospedero, en particular, las subpoblaciones de células T, juega un papel central en el desarrollo de la patología.

2.1.2 Inmunidad Adaptativa. 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). Estas células reconocen el antígeno unido a las moléculas del complejo mayor de histocompatibilidad y junto con moléculas coestimuladoras como CD80, CD86, CD40 y la acción de citoquinas como IL-12, inducen la activación de los linfocitos T (Th0) y la posterior diferenciación a Th1 [84]. Este linfocito Th1 a su vez, produce IFN- γ que estimula tanto a los linfocitos B para que produzcan anticuerpos efectoros, como a los linfocitos T CD8⁺ para que destruyan el patógeno [15]. Sin embargo, estudios realizados por Vitelli y colaboradores encontraron una correlación entre la frecuencia de linfocitos T CD4⁺ que no expresan la molécula coestimuladora CD28 y la expresión de IL-10 en pacientes en fase indeterminada [95]. 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.

Los pacientes con CCC presentan un marcado infiltrado inflamatorio en el tejido cardíaco. Las células mononucleares incrementan la producción de citoquinas proinflamatorias, llevando a niveles aumentados en plasma de TNF- α e IFN- γ , los cuales son, incluso, detectados en individuos con las formas indeterminadas de la enfermedad [1; 75; 89], debido probablemente a la persistencia del parásito. 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 [30].

Adicionalmente, estudios de expresión génica en modelos murinos analizando tejidos de miocardio con la forma crónica de EC, mostraron regulación positiva en genes relacionados con respuesta inmune, entre ellos genes inducidos por IFN- γ , como el factor regulador de interferon *IRF1*. La expresión incrementada de *IRF1*, fue confirmada por PCR en tiempo real [24; 37; 60]. Estas evidencias sugieren que las citoquinas TNF- α e IFN- γ y el factor de transcripción IRF-1 están participando en la inducción de las lesiones del tejido cardiaco, así como también, en el desarrollo de la CCC en pacientes infectados con *T. cruzi* [28; 30; 89].

Recientemente, fue propuesto que el desequilibrio entre los mecanismos oxidantes/antioxidantes (como, por ejemplo, óxido nítrico y la enzima superóxido dismutasa) y citoquinas pro/antiinflamatorias (como TNF e IL-10), así como la persistencia de determinadas subpoblaciones de células T CD8⁺ en el tejido cardíaco, podrían influenciar la gravedad de las lesiones desarrolladas por el individuo infectado, que serían consecuencia de una relación duradera y compleja entre el parásito y la respuesta inmune regulada ineficientemente de los individuos infectados que desarrollan las formas graves de la EC [28].

3. ASPECTOS GENETICOS

La gran variación en el desarrollo de las diferentes formas clínicas y los diferentes grados de severidad evidenciados en EC, indica que existen varios factores que contribuyen a la heterogeneidad observada. Algunos de estos factores serán inherentes al genoma del parásito y otros estarán relacionados con la constitución genética del hospedero. De esta manera, la variación en el genoma del hospedero (polimorfismos genéticos), podrían tener un papel importante en el desarrollo de resistencia o susceptibilidad a la CCC.

Los polimorfismos de un único nucleótido (SNP) son la forma más prevalente de variaciones genéticas entre individuos. En base a los resultados de secuenciación se estima que el genoma humano contiene aproximadamente 10 millones de SNPs ^[35]. Dada su alta frecuencia, estabilidad y bajas tasas de mutación, estas variantes polimórficas han sido ampliamente utilizadas en estudios de asociación por su posible papel en la patogénesis de diversas enfermedades complejas y poligénicas, es decir, aquellas enfermedades cuyo fenotipo está influenciado por factores tanto ambientales como genéticos, donde cada uno de ellos ejerce un efecto moderado sobre el desarrollo de la enfermedad ^[65]. Teniendo en cuenta lo anterior, la EC podría catalogarse como una enfermedad compleja dada la variedad de factores que podrían influenciar su desarrollo, especialmente la variabilidad genética del hospedero y del parásito, además de los factores medioambientales.

Varios estudios han evaluado la ocurrencia de polimorfismos genéticos en genes que codifican moléculas relacionadas con el control de la respuesta inmune y la susceptibilidad genética a desarrollar CCC. Considerando el papel fundamental de las moléculas del Complejo Mayor de Histocompatibilidad (MHC) de clase II en el proceso de presentación antigénica, se estudiaron polimorfismos en las moléculas DRB1 y DQB1 en pacientes chagásicos peruanos. Ellos presentaron una

frecuencia disminuida de los alelos DRB1*14 y DQB1*0301 con relación a los individuos no infectados, sugiriendo un papel protector de estas moléculas a la infección crónica ^[63]. De igual forma, se han realizado varios estudios evaluando polimorfismos ubicados en la región promotora del gen *TNFA* ^[26], con resultados contradictorios.

Otros genes han sido estudiados en relación al desarrollo de CCC como son *MIF* ^[92], *IL1B* e *IL1RN* ^[23], y *MASP2* ^[12]. De igual forma, el grupo de investigación dentro del cual se adelantó este trabajo, utilizando estudios de casos y controles encontró asociación de CCC con citoquinas proinflamatorias como *IL1B* e *IL12B*, donde se mostró que el alelo G del SNP +5810 del gen *IL1B* estuvo asociado con un incremento al riesgo de CCC. Además se demostró el genotipo GG de este SNP incrementó significativamente la susceptibilidad a CCC ^[32] y en el caso de los polimorfismos en la región 3'UTR del gen de *IL12B*, este estudio sugiere que estos podrían influenciar la susceptibilidad al desarrollo de CCC ^[101]. En el caso de *INFG*, los datos del estudio sugieren que el SNP +874 podría estar involucrado en la susceptibilidad, pero no en la progresión a EC (Torres et al., 2010). Por otra parte, se realizaron estudios en genes que codifican para citoquinas antiinflamatorias y sus receptores como *IL4RA*, *IL4*, *IL10*. Los resultados de este estudio sugieren que el genotipo AA del SNP +148 de *IL4R* tiene una asociación débil con el desarrollo de CCC. No se observaron asociaciones en los polimorfismos de los genes *IL4* e *IL10* ^[31]. Están en proceso de publicación dos asociaciones con el receptor de quimioquinas *CCR5* y *TNFA*.

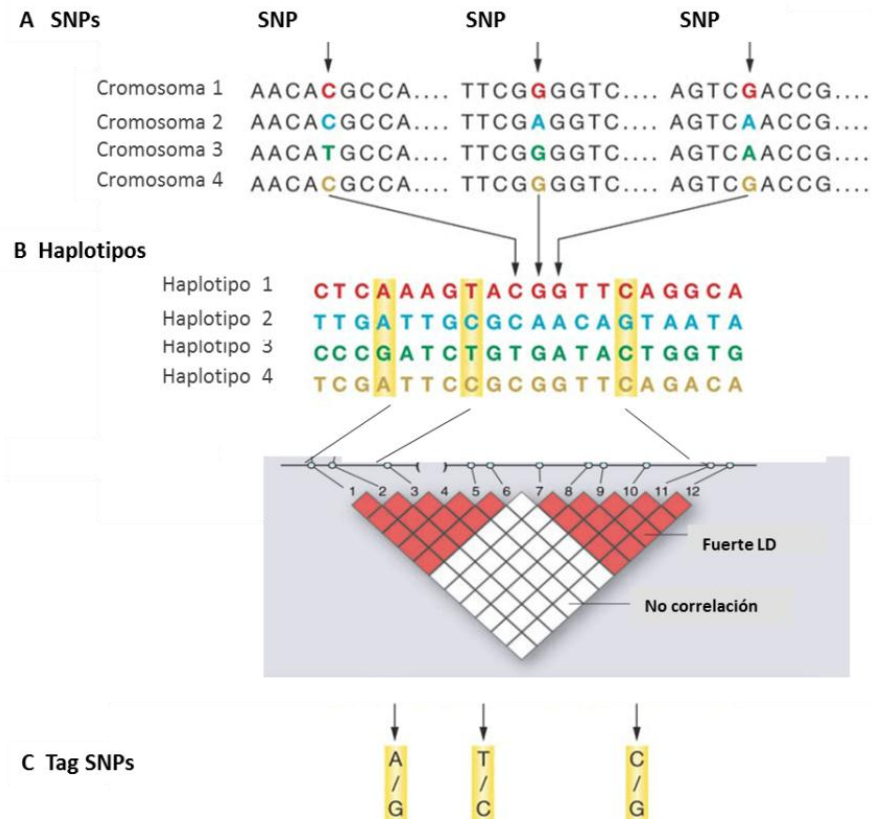
En conjunto, los datos anteriores sugieren la participación de moléculas involucradas en la presentación antigénica y control del parásito en el proceso de migración celular y en la regulación de la respuesta inmune en la patogenia de la CCC. Sin embargo, algunos de los estudios no han podido ser replicados y se han encontrado discrepancias entre las diferentes poblaciones; lo cual podría 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).

La identificación de los genes implicados en enfermedades complejas se ha visto facilitada cada día más debido a la disponibilidad de bases de datos con mayor información sobre las variantes genéticas en los distintos grupos étnicos a través del Proyecto Internacional HapMap (www.hapmap.org). Este proyecto ha llevado a superar algunas de las dificultades para el mapeo de genes de susceptibilidad en enfermedades complejas, junto con el desarrollo de mejores y más eficaces métodos de genotipificación a gran escala, la reducción en el número de SNPs necesarios en la genotipificación y el diseño de algoritmos bioestadísticos y programas de computación para el manejo de grandes cantidades de datos.

Trabajos recientes sugieren que el genoma humano contiene regiones cromosómicas discretas con baja diversidad de haplotipos, denominados bloques de haplotipos, los cuales están separados por puntos calientes de recombinación. Por definición, los SNPs dentro de un bloque de haplotipos pueden estar en fuerte DL (Figura 7). Cuando los marcadores se encuentran en DL ($r^2=1$) en la población, existe información redundante, por lo tanto, la genotipificación de un único SNP provee toda la información de aquel con el cual está en DL. La mayoría de los haplotipos dentro de un bloque pueden ser identificados usando un número más pequeño de SNPs, conocidos como SNPs etiqueta o “tagSNP”^[91]. Usando tales SNPs se puede reducir considerablemente el número de variantes a analizar y por lo tanto los costos y esfuerzos que implican los estudios de asociación a gran escala.

Figura 6. Estructura de la variación genética



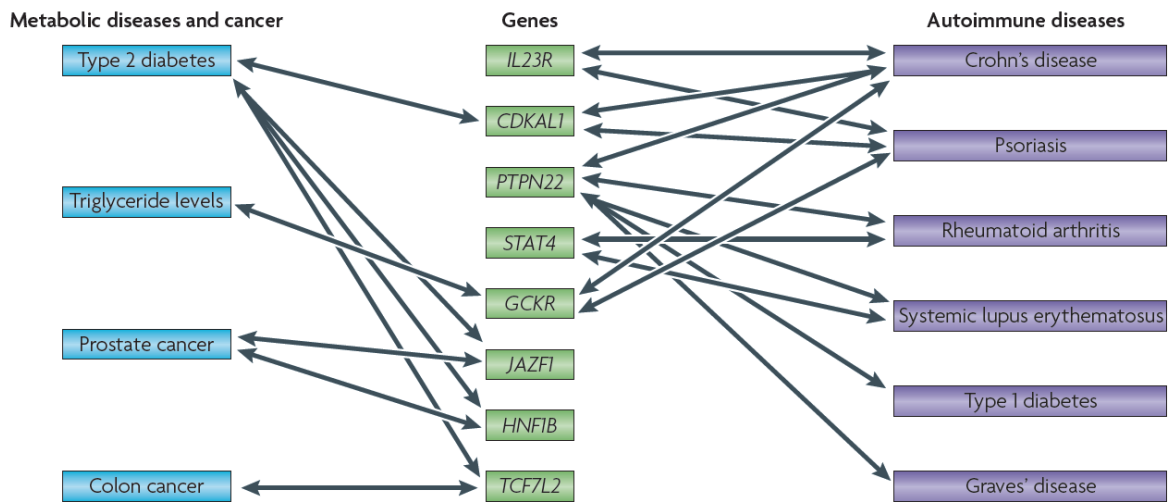
Fuente: Modificado de Altshuler D. *Science* 2009

Estos avances tanto en la determinación empírica de la estructura de DL de SNPs a través del genoma, así como las técnicas de alto rendimiento de genotipificación, sentaron las bases para el descubrimiento de variantes genéticas comunes asociadas con varias enfermedades complejas a través de los estudios amplios del genoma o GWAs. Estos estudios han proporcionado asociaciones estadísticamente significativas en más de 300 loci diferentes en el genoma humano [43]. Casi todas las categorías de enfermedades han sido estudiadas, incluyendo enfermedades cardiovasculares, neurodegenerativas, metabólicas, autoinmunes, varios tipos de cáncer y enfermedades infecciosas. Han sido publicados estudios en diabetes tipo 1 [8], enfermedad de Crohn [33], esclerosis

múltiple ^[47], Lupus Eritematoso Sistémico ^[45], Artritis reumatoide ^[85] y enfermedades infecciosas como SIDA ^[67], leishmaniasis cutánea ^[17], malaria ^[48; 77] y tuberculosis ^[5].

El resultado más interesante de estos estudios, los cuales conectan intervalos genómicos con rasgos complejos, es un nuevo entendimiento de los fundamentos moleculares y las vías de muchas enfermedades ^[98]. Cabe destacar que algunos de los genes o loci genómicos que han sido identificados a través de estudios GWAs no estaban identificados como genes relacionados con el rasgo complejo bajo investigación. Por ejemplo, estudios recientes identificaron nuevos genes de riesgo para diabetes tipo 2, que afectan la formación y función de células β pancreáticas, así como de vías que afectan los niveles de glucosa. Para la mayoría de los genes identificados no había una sospecha previa de que tuvieran un papel en la diabetes como es el caso del gen *MTNR1B*, el cual codifica para uno de los dos receptores conocidos de melatonina ^[13; 34]. Así mismo, muchos de los loci asociados con esclerosis múltiple involucran función inmune, incluyendo genes de receptores de interleuquinas *IL2RA* e *IL7RA*, y el locus *HLA-DRA*, sin embargo, también está asociado el gen *KIF1B*, un miembro de la familia de las quinesinas que codifica una proteína que transporta vesículas sinápticas al nervio terminal y está involucrada en la función axonal y que por lo tanto no se pensaba estuviera asociado con esclerosis múltiple ^[4]. Por otra parte, existen varios casos en los cuales genes o un intervalo genómico ha estado asociado con dos o más enfermedades distintas. Los ejemplos incluyen diferentes genes receptores de interleuquinas que están asociadas con enfermedad de Crohn, esclerosis múltiple, lupus eritematoso sistémico y artritis reumatoide ^[98] (Figura 8).

Figura 7. Superposición de los factores de riesgo genéticos para enfermedades comunes



Fuente: Frazer *et. al* 2009

Estos avances en la asociación de genes con muchas enfermedades, ha llevado a sugerir la necesidad de reescribir los libros de medicina para tener una mejor comprensión de la interconectividad de las bases moleculares que subyacen a las distintas enfermedades.

3.1 CAMK2A

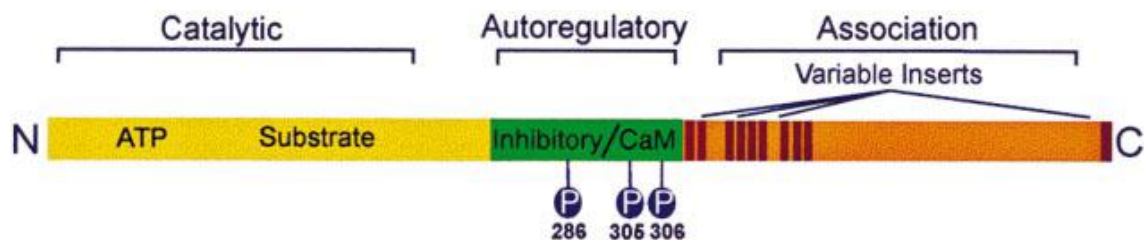
CAMK2 es una proteína quinasa multifuncional dependiente de calcio/calmodulina codificada por cuatro genes (α , β , γ , δ) en diversos eucariotas [44; 74]. CAMK2A codifica la subunidad alfa CAMK2.

α -CAMK2 es una subunidad de CAMK2 y tiene un peso aproximado de 50 KDa. Esta subunidad posee tres dominios: catalítico, autorregulatorio y de asociación. Esta proteína es una quinasa serina/treonina multifuncional que ha sido implicada

en regular muchos aspectos de la función celular en respuesta a la señalización del Ca^{+2} , incluyendo la regulación del metabolismo de carbohidratos, aminoácidos y lípidos, receptores/canales de iones, síntesis y liberación de neurotransmisores, transcripción y traducción, organización del citoesqueleto y homeostasis de calcio [83]. Existe una fuerte evidencia del papel de CAMK2 en la patofisiología del cardiomiocito en hipertrofia y falla cardíaca [29; 102].

α -CAMK2 es mantenida en un estado autoinhibido por el dominio autorregulatorio que previene la unión de sustratos. El dominio de unión a Ca^{+2} /calmodulina está contiguo al dominio regulatorio [44].

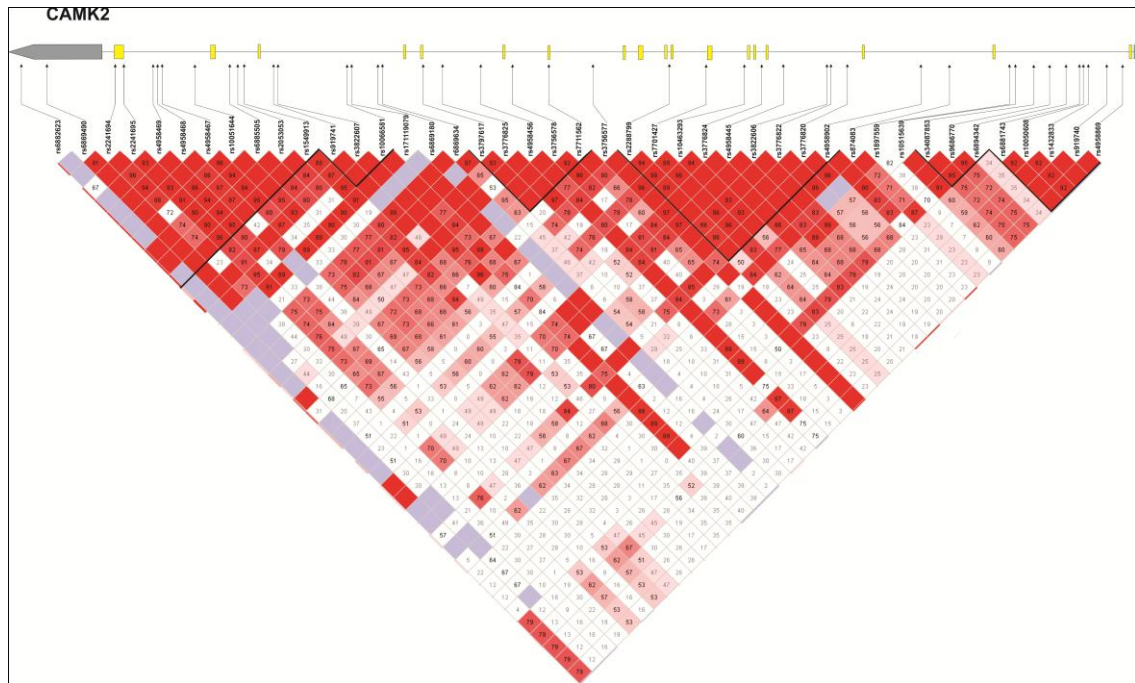
Figura 8. Diagrama lineal de α -CAMK2



Fuente: Hudmon and Shulman 2002

El gen *CAMK2A* cubre una región de 70kb sobre el cromosoma 5 y está conformado por 19 exones. Posee dos promotores transcripcionales diferentes, uno de ellos interno, el cual lleva a la producción de la proteína aKAP. El gen *CAMK2A* codifica tres variantes: α y αB que se expresan después del nacimiento solo en determinadas regiones del sistema nervioso central y aKAP que ha sido detectada en músculo cardíaco y esquelético, donde se oligomeriza con la forma activa de *CAMK2* en el retículo sarcoplásmico [10; 86; 87].

Figura 9. Mapa de DL del gen CAMK2A



Fuente: Modificado de Haploview 4.2

El gen *CAMK2A* tiene alrededor de 100 SNPs en el cual se destacan 6 bloques con alto DL, sin embargo de los estudios de GWAs adelantados hasta el momento solo se ha encontrado asociación con desorden de conducta del SNP rs2053053 ubicado en un intron. Este estudio fue realizado en familias caucásicas ^[49].

3.2 IRF1

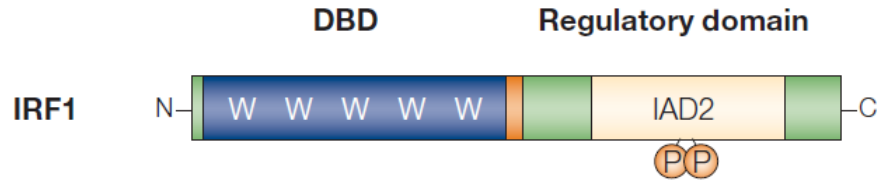
El factor regulatorio de interferon 1 (IRF1) es un miembro de la familia de factores de transcripción IRFs que se expresa en la mayoría de tipos celulares, incluyendo células T, células NK y macrófagos ^[7; 36; 51]. Su expresión puede ser generada por varios estímulos como infección viral, concavalina A, lipopolisacárido (LPS) y citoquinas tales como IL-12, IL-1 e interferones tipo I y II ^[18; 55].

IRF1 afecta la expresión de muchos genes y tiene un papel complejo en la diferenciación de las células T, especialmente en la generación de una respuesta Th1. Está involucrado en la producción de IFN- γ , iNOS e IL-12 por macrófagos y células dendríticas [62]. La expresión de *IRF1* puede además ser inducida por TNF- α [46] y antagonizada por IL-4 [52]. La actividad de IRF-1 es esencial para el reconocimiento de microorganismos y la presentación antigénica. En células presentadoras de antígeno, IFN- γ induce la producción de IRF-1 a través de la acción de STAT1 y estimula la producción de IL-12. A su vez, IL-12 actúa sobre las células NK para inducir la expresión de *IRF1* [36].

Los efectos biológicos de IRF-1 han sido estudiados en diversas enfermedades como choque séptico [81], lupus eritematoso sistémico [73] y complicaciones autoinmunes de síndromes mielodisplásicos, en donde deficiencias de *IRF1* estuvieron asociadas con protección a mortalidad inducida por LPS y disminución en la incidencia de manifestaciones autoinmunes, acompañadas por una disminución en la producción de TNF- α , IFN- γ , ON e IL-12 [39].

El dominio de unión al ADN está localizado en los primeros 115 aminoácidos de la región amino-terminal y contiene un motivo formado por 5 residuos de triptófano los cuales están separados por 10-18 aminoácidos. Este motivo media la unión de IRF1 al “core” de la secuencia de ADN, GAAA es el elemento de respuesta estimulado por interferón. Además contiene un dominio carboxi-terminal de asociación a otros miembros de la familia de IRF, el cual facilita la heterodimerización [55].

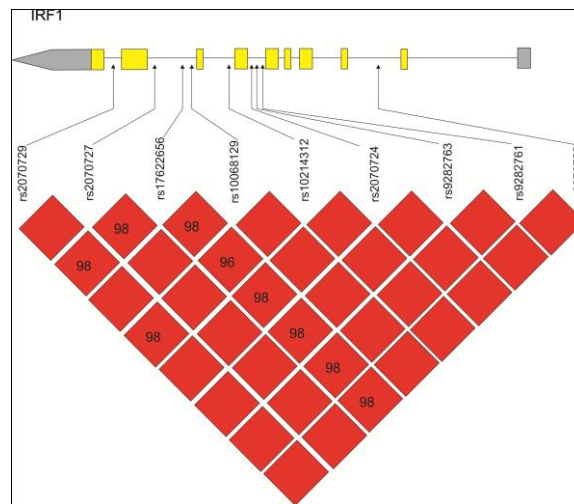
Figura 10. Estructura lineal de IRF-1



Fuente: Lohoff *et al* 2005

El gen que codifica IRF-1 se encuentra ubicado en el brazo largo del cromosoma 5 (5q31.1), entre los genes C5 (componente del complemento 5) e IL-5. El gen *IRF1* tiene un tamaño de 7543 Kpb y lo conforman nueve intrones y 10 exones, en el cual las secuencias de iniciación ATG y terminación TAG son codificadas en el segundo y último exón, respectivamente [66].

Figura 11. Mapa de DL del gen *IRF1*



Fuente: Modificado de Haploview 4.2

IRF1 tiene 19 SNPs y un bloque en total DL. Polimorfismos en *IRF1* se han estudiado en pacientes con asma [61], enfermedad celiaca [80], artritis juvenil idiopática [25], esclerosis múltiple [94], enfermedad de Graves [99] y cáncer cervical

uterino ^[53]. Además, se ha encontrado asociación de polimorfismos en la región promotora de *IRF1* con actividad transcripcional. Donn y colaboradores reportaron que polimorfismos en la región 3'UTR confieren susceptibilidad a artritis juvenil idiopática y sugirió que este polimorfismo podría afectar la estabilidad del ARNm de *IRF1* (Donn et al 2001). En la enfermedad de Chagas no se han publicado hasta la fecha artículos o investigaciones sobre polimorfismos génicos en este gen.

4. JUSTIFICACION

En el estudio de la EC no hay reportes de estudios de mapeo genómico realizados en humanos en relación con la susceptibilidad a la infección con el parásito, ni con el desarrollo y severidad de la sintomatología clínica hasta el momento y los que se han realizado utilizaron modelos murinos ^[41]. Wrightsman y colaboradores en la década de los 80 encontraron evidencia de una posible región de susceptibilidad a desarrollar la enfermedad, relacionada directamente con la supervivencia a la infección, en el locus H-2 murino, ubicado en el cromosoma 17 ^[96; 97], el cual corresponde al Complejo Mayor de Histocompatibilidad humano. En un estudio más reciente con cepas de ratones susceptibles y resistentes y mapeando el genoma completo a intervalos de 10-15 cM con microsatélites, se encontraron regiones que influenciaron marcadamente el aumento de la severidad de la EC, nuevamente la región del cromosoma 17 sobre el CMH murino, aunque también se ubicaron regiones candidatas en los cromosomas 5 y 13, hallazgos corroborados posteriormente por el mismo grupo ^[41].

Hallazgos previos de nuestro grupo, en humanos, sugieren la ubicación de varias regiones cromosómicas asociadas al aumento de la susceptibilidad a desarrollar CCC, principalmente en los cromosomas 2 ^[32], 3 (datos en proceso de publicación) y 5 ^[101].

La región cromosómica 5q31.1-q33.1, donde mapea el gen IL12B es de especial interés, ya que abarca un grupo de genes de citoquinas y otras proteínas importantes para la respuesta inmune Th1/Th2, que incluyen además IL4, IL5, IL13, CD74, TIMD4, C1QTNF2, así como genes inmunoreguladores transcripcionales (IRF1 y TCF7) y quinasas (CAMK2A e ITK) implicadas en procesos de diferenciación y proliferación de células T. Esta región cromosómica ha sido identificada como un locus de susceptibilidad para diversas enfermedades infecciosas como esquistosomiasis(Kouriba et al., 2005), leishmaniasis (Jeronimo

et al., 2007), malaria (Naka et al., 2009) y tuberculosis (Ridruechai et al., 2010), también con enfermedades autoinmunes como enfermedad de Crohn (Onnie et al., 2006), así como para otras condiciones inflamatorias como psoriasis y dermatitis atópica (Chang et al., 2008; Marsh et al., 1994). En leishmaniasis visceral, por ejemplo, se identificaron asociaciones de riesgo con severidad en los genes LECT2, TGFB1 y en malaria se encontró asociación con susceptibilidad a malaria severa con el gen IL13.

En el caso de EC no se han adelantado este tipo de estudios en humanos, por lo tanto es importante resaltar que éste sería el primer estudio de este tipo que busca asociación de una región cromosómica con el desarrollo y severidad de esta enfermedad. El mapeo fino de esta región previamente identificada como asociada con CCC nos permitirá identificar loci mayores de susceptibilidad que podrían estar relacionados con los mecanismos fisiopatogénicos de la enfermedad y que podrían ser en un futuro utilizados como biomarcadores para diagnóstico, pronóstico o como blancos terapéuticos.

5. OBJETIVOS

5.1 OBJETIVO GENERAL

Identificar grupos de genes asociados con susceptibilidad o resistencia al desarrollo de cardiomiopatía chagásica, mediante un mapeo de alta resolución utilizando “tagSNPs”, en la región cromosómica 5q31.1-q33.1, en pacientes infectados (seropositivos) con presentación o no de la enfermedad que residan en zona endémica del departamento de Santander (Colombia).

5.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Determinar las frecuencias alélicas y genotípicas de “tagSNPs” presentes en la población a estudiar.
- Identificar los haplotipos presentes en la población a estudiar.
- Establecer la existencia o no de asociación entre las frecuencias alélicas, genotípicas y de los haplotipos presentes en nuestra población con la susceptibilidad o resistencia al desarrollo de cardiopatía chagásica.
- Replicar la asociación con susceptibilidad al desarrollo de la cardiopatía chagásica del polimorfismo +1188 en la región *3UTR* del gen *IL12B* identificado por nuestro grupo.

6. MATERIALES Y METODOS

6.1 POBLACIÓN DE ESTUDIO

Se llevó a cabo un estudio poblacional descriptivo de asociación, utilizando el diseño de casos y controles. El estudio incluyó 400 individuos quienes residieron por lo menos durante 10 años en las provincias Comunera y Guanentina del departamento de Santander y que tenían evidencia serológica de infección por *Trypanosoma cruzi*, determinada por la presencia de anticuerpos con pruebas de ELISA (enzyme-linked immunosorbent assay) (Biokit; España) y Hemaglutinación Indirecta (Wiener Lab.; Argentina). Todos los individuos viven en condiciones ambientales y socioeconómicas similares. Los pacientes fueron reclutados en su mayoría en estudios de campo realizados en la zona. La población de la región es una mezcla homogénea y no hay concentración de grupos étnicos.

Los pacientes fueron evaluados clínicamente y se les realizaron pruebas electrocardiográficas con la colaboración de la Fundación Cardiovascular de Colombia (FCV) y fueron clasificados en asintomáticos y sintomáticos según los criterios de la Organización Panamericana de la Salud (Tabla 1). Aquellos pacientes con alteraciones cardíacas demostradas por evaluación clínica y pruebas electrocardiográficas, tales como electrocardiograma y ecocardiograma, que mostraron trastornos de la conducción y/o cardiopatía estructural fueron clasificados como sintomáticos o con CCC y representaron el grupo de casos (n=200, edad promedio: 55 años). Los pacientes sin alteraciones cardíacas demostradas por evaluación clínica y por pruebas electrocardiográficas fueron clasificados como asintomáticos y representaron el grupo control (n=200, edad promedio: 47 años).

Tabla 1. Clasificación de los pacientes según grados de severidad de EC

| | |
|------------------|--|
| Grado I | Infección chagásica sin compromiso clínico, radiológico ni electrocardiográfico de lesión cardiaca. |
| Grado II | Infección chagásica con sintomatología de moderada a nula, radiología normal o indicativa de hipertrofia cardiaca leve o con alteraciones electrocardiográficas como: extrasístoles, bloqueo aurículo-ventricular incompleto, bloqueo completo o incompleto de la rama derecha/izquierda del haz de His, alteraciones primarias de repolarización. |
| Grado III | Infección chagásica con sintomatología evidente, hipertrofia cardiaca 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 cardiaca. Estudio radiológico que muestre cardiomegalia extrema o electrocardiograma con alteraciones graves o múltiples (arritmias complejas y graves zonas eléctricamente inactivas). |

Rutinariamente, a todos los pacientes se les hizo un cuestionario donde se consignaron los datos personales, epidemiológicos y clínicos. Todos los pacientes incluidos en el estudio aceptaron participar voluntariamente y firmaron la declaratoria de consentimiento informado. El estudio fue aprobado por los Comités de Ética de la Universidad Industrial de Santander y de la FCV y está anidado en un proyecto financiado por Colciencias.

Se analizaron 11 genes ubicados en el loci 5q31.1 (5Mpb, 130.400.001-135.400.000 pb) y 5q33.1 (4.3Mpb, 155.600.001-159.900.000 pb), donde mapea el gen *IL12B*. Estos genes codifican para proteínas implicadas en el montaje de respuesta inmune (*IL4*, *IL12B*, *IL13*, *IL5*, *CD74*, *TIMD4*, *C1QTNF2*), factores de transcripción (*IRF1*, *TFC7*) y moléculas de señalización (*ITK*, *CAMK2A*).

6.2 SELECCIÓN DE TagSNPs

Se seleccionaron 102 tagSNPs utilizando la información derivada del Proyecto HapMap (www.hapmap.org) basados en las frecuencias de la población de

ancestría Mexicana-Americana [MEX] (NCBI Build 36 assembly) y utilizando el programa Tagger del software Haploview 4.2 ^[9]. Se tuvieron en cuenta como criterios de selección tagSNP con una frecuencia alélica mínima (MAF) ≥ 0.05 y LD (coeficiente $r^2 \geq 0.80$). Adicionalmente, se tuvo en consideración el valor técnico “score” de predicción del éxito del ensayo para cada marcador (score ≥ 0.6) suministrado por Illumina, Inc.

6.3 GENOTIPIFICACIÓN DE POLIMORFISMOS

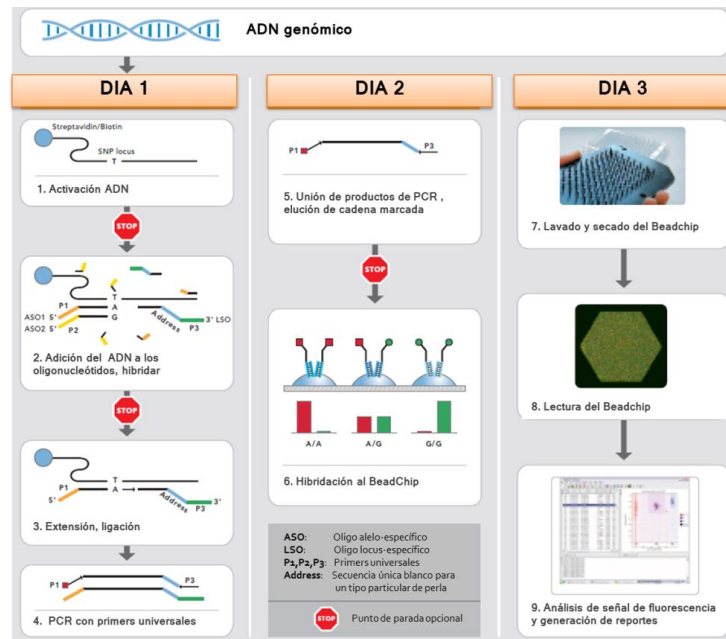
La genotipificación de los “tagSNPs” se llevó a cabo en el Centro Nacional de Genotipado (CeGen), en Madrid (España) haciendo uso de la tecnología de microarreglos (BeadArray) de la plataforma Illumina, mediante el ensayo de genotipificación GoldenGate.

Se utilizó ADN genómico aislado a partir de 5 ml de sangre anticoagulada con EDTA, mediante el método de *salting-out* ^[56]. La cuantificación de ADN se realizó utilizando PicoGreen® (Invitrogen, Inc., USA).

Previo al proceso de hibridación con el microarreglo, el ADN es fragmentado y activado con biotina para la unión a las esferas paramagnéticas y resuspendido en un buffer de hibridación adecuado. Se utilizaron tres oligonucleótidos para cada SNP. Dos oligos eran específicos de cada alelo llamados Oligos alelo-específico (ASOs), los cuales tienen una porción 3' que hibrida al ADN en uno de los alelos del SNP y una porción 5' que es complementaria a un primer universal de PCR cada uno asociado con un alelo diferente. El tercer oligo que hibrida varias bases corriente abajo del sitio del SNP, llamado Oligo específico de locus (LSO), contiene en el extremo 5' una secuencia específica del locus del SNP y una secuencia de dirección complementaria a una de las secuencias de los oligos inmovilizados en el microarreglo. Los oligonucleótidos se hibridan a la muestra de ADN genómico unida a las esferas paramagnéticas. Posterior a la hibridación, se

llevan a cabo varios pasos de lavado, reduciendo el ruido al remover el exceso de oligonucleótidos no hibridados. Posteriormente, se lleva a cabo la extensión del ASO apropiado y la ligación del producto extendido al LSO. Los productos unidos proporcionan el molde para la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) usando iniciadores universales P1, P2 y P3. Los iniciadores P1 y P2 están marcados con las sustancias fluorescentes Cy3 y Cy5, y son específicos de un tipo de perla. Después del proceso de PCR, las cadenas sencillas de ADN marcadas, se hibridadas a un tipo de perla complementaria a través de su secuencia única de dirección sobre el microarreglo. Después de la hibridación se analiza la señal de fluorescencia sobre el microarreglo (BeadChip), mediante un escáner de fluorescencia (BeadArray Reader) el cual a través del software Illumina BeadStudio 3.2, asigna valores de intensidad de la señal fluorescente a partir de una línea basal; estos datos se normalizan y se da información de la presencia o no del alelo del SNP en la muestra de ADN. Los valores posteriormente fueron agrupados en genotipos locus para cada muestra (Figura 13).

Figura 12. Ensayo de genotipificación



Fuente: Modificada de Illumina, Inc. 2004

6.4 ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Los datos de genotipado obtenidos de las micromatrices fueron sometidos inicialmente a control de calidad, el cual se llevó a cabo sobre SNPs e individuos usando el software PLINK v1.07 ^[69]. Los SNPs e individuos con tasa de genotipado menor al 90%, frecuencia alélica mínima (MAF) < 0.01 y desviación de Equilibrio del Hardy-Weinberg con valores $p < 0,001$ fueron eliminados.

La estructura de la población se determinó mediante el análisis de los datos de genotipificación de 523 marcadores para todos los individuos a través del algoritmo de Monte Carlo basado en cadenas de Markov, utilizando el software Structure 2.2 ^[68]. Se aplicó el control genómico (λ) sobre los valores p para reducir la estratificación de la población.

Se compararon las frecuencias alélicas y genotípicas entre pacientes asintomáticos y sintomáticos para identificar la presencia de asociaciones genotipo-fenotipo enfermedad, mediante las pruebas de χ^2 (chi-cuadrado) y Cochran-Armitage. Un valor de $p < 0.05$ fue considerando como estadísticamente significativo. Los valores p de los SNPs significativos fueron corregidos por múltiples pruebas (Bonferroni, Benjamini-Hochberg FDR, test basado en permutaciones). El efecto genético de cada polimorfismo fue evaluado por modelos de regresión logística para estimar las razones de posibilidades (OR) e intervalos de confianza de 95% por SNP, estos análisis se llevaron a cabo asumiendo modelos de herencia dominante o recesiva ajustado por edad y género como covariables, utilizando el software PLINK v1.07 ^[69]. Se analizaron patrones de DL (D' y r^2) alrededor de los SNPs y se determinaron bloques de haplotipos con el método de Gabriel *et al.* usando el software Haploview 4.2 ^[9].

6.5 CONSIDERACIONES ETICAS

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 obtención de suero y extracción de ADN. Los pacientes fueron informados de la naturaleza del estudio, la confidencialidad de los resultados y la posibilidad del uso de las muestras obtenidas para adelantar estudios posteriores relacionados con esta enfermedad. Todos los pacientes aceptaron participar voluntariamente en el estudio y firmaron la declaratoria de consentimiento informado (Anexo A). El estudio fue aprobado por los Comités de Ética de la Universidad Industrial de Santander y la FCV. A cada uno de los pacientes que aceptaron participar en el estudio se le informaron los resultados de las pruebas serológicas y el 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.

7. RESULTADOS

Después de realizar el control de calidad de los datos obtenidos, de los 102 “tagSNPs” genotificados, se analizaron un total de 85 SNPs de 371 pacientes del total de 400 (190 casos y 181 controles). (Tabla 2).

Tabla 2. Características de la población en estudio

| | Género | | Edad promedio (años) |
|------------------|-------------------|-------------------|----------------------|
| | Femenino | Masculino | |
| Casos | 96 (50.5%) | 94 (49.5%) | 54.8 |
| Controles | 115 (63.6%) | 66 (36.4%) | 45.2 |

7.1 ESTRUCTURA POBLACIONAL

El coeficiente de Wright ($F_{ST} = 0.012$) mostró que la población no está estructurada. Según Hartl & Clark (1997), los valores de F_{ST} por debajo de 0,05 son evidencia de poca estructura poblacional.

7.2 ANÁLISIS DE ASOCIACIÓN ALÉLICA Y GENOTÍPICA

Se observaron diferencias estadísticamente significativas en la distribución de 5 alelos de SNPs entre los pacientes asintomáticos y sintomáticos, con valores $p < 0.05$ no corregidos utilizando la prueba de tendencia de Cochran-Armitage. Cuando esas asociaciones fueron ajustadas en modelos de herencia dominante y recesiva por regresión logística con edad y género como covariables, los SNPs rs6882623 y rs10051644 ubicados en el gen *CAMK2A* y el SNP rs2070729 ubicado en el gen *IRF1*, permanecieron asociados significativamente ($p=0.013$,

$p=0.013$, $p=0.026$, respectivamente) con el desarrollo de CCC. (Tabla 3 y Figura 14). No se encontró asociación para ninguno de los genotipos analizados.

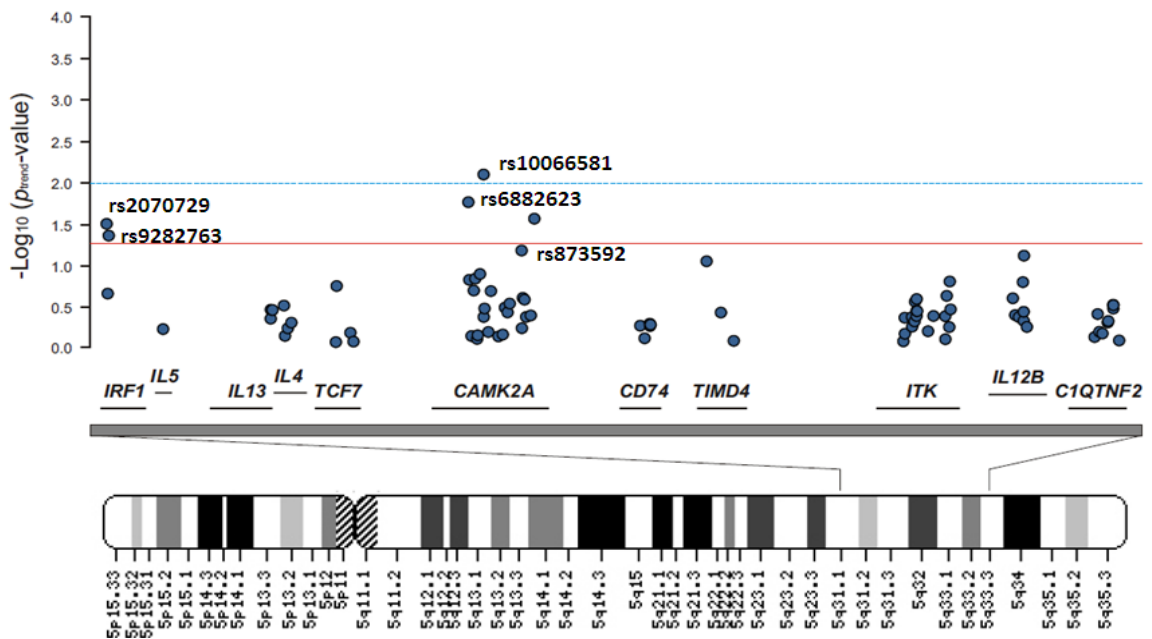
Tabla 3. Asociación de SNPs con el desarrollo de cardiomiopatía chagásica

| SNP | Gen | Alelos | Posición (pb) | Frecuencia alélica mínima | | P^a | Regresión logística | | |
|------------|---------------|--------|---------------|---------------------------|---------------|-------|---------------------|------------------|-------|
| | | | | Sintomáticos | Asintomáticos | | Modelo de Herencia | OR (IC 95%) | P^b |
| | | | | (n= 190) | (n=181) | | | | |
| rs2070729 | <i>IRF1</i> | G/T | 131819921 | 0.463 | 0.381 | 0.028 | Recesivo | 1.92 (0.98-1.86) | 0.026 |
| rs9282763 | <i>IRF1</i> | G/A | 131822133 | 0.297 | 0.371 | 0.040 | Dominante | 0.69 (0.44-1.08) | - |
| rs6882623 | <i>CAMK2A</i> | G/A | 149599374 | 0.087 | 0.142 | 0.015 | Dominante | 0.50 (0.29-0.87) | 0.013 |
| rs10066581 | <i>CAMK2A</i> | A/G | 149615681 | 0.110 | 0.055 | 0.006 | Dominante | 2.09 (1.17-3.75) | 0.013 |
| rs873592 | <i>CAMK2A</i> | T/C | 149669756 | 0.039 | 0.080 | 0.019 | Dominante | 0.52 (0.25-1.08) | - |

^a Valor P obtenido con la prueba estadística Cochran-Armitage

^b Valor P obtenido por regresión logística bajo modelos de herencia dominante y recesivo ajustado por edad y género

Figura 13. Asociación de SNPs individuales



7.3 ANÁLISIS DE DESEQUILIBRIO DE LIGAMIENTO

El análisis de desequilibrio de ligamiento de los SNPs estudiados reveló un fuerte nivel de DL entre los SNPs dentro del loci mapeado. Diecisiete bloques de haplotipos fueron observados para los 85 SNPs, un bloque de haplotipo para los genes *IRF*, *IL4*, *CD74*, *IL12B*, *C1QTNF2* y seis bloques de haplotipo para los genes *CAMK2A*, *ITK* (Figura 10).

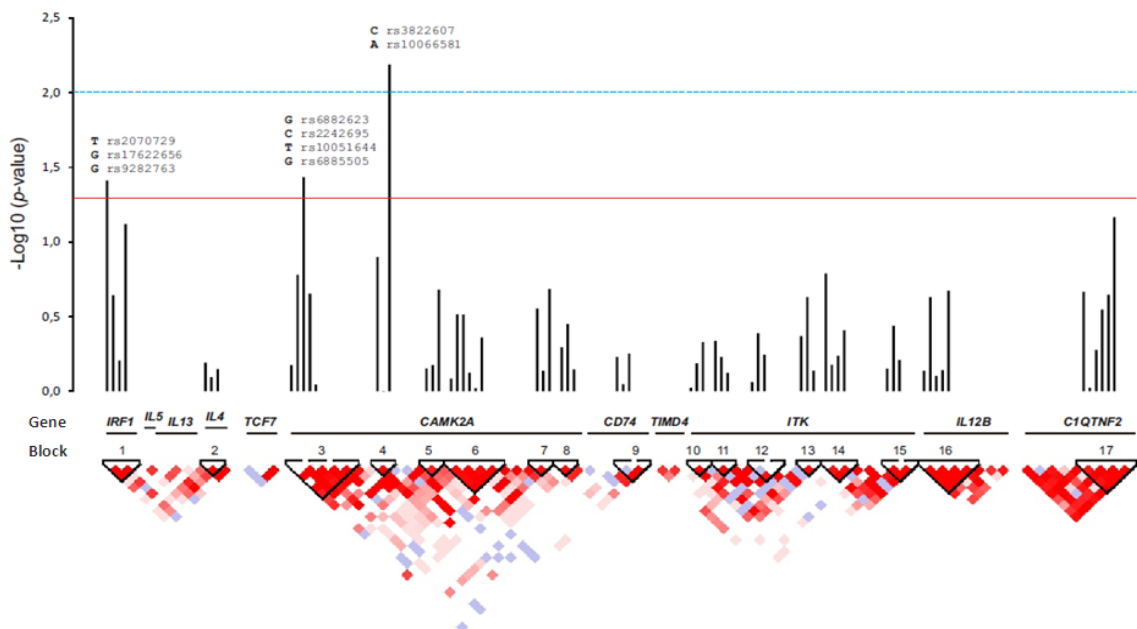
Dos haplotipos ubicados en el gen *CAMK2A*: CA formado por los rs3822607 y rs1006658 ($p=0.06$; OR 2.12) y GCTG formado por los rs6882623, rs2241695, rs10051644, rs6885505 ($p=0.037$; OR 0.59) y un haplotipo ubicado en el gen *IRF1* TGG formado por los rs2070729, rs17622656 y rs9282763 ($p=0.039$; OR 0.72), mostraron resultados estadísticamente significativos con EC (Figura 15 y Tabla 4). Los haplotipos restantes no mostraron asociación significativa.

El haplotipo CA presentó asociación con susceptibilidad al desarrollo de CCC (OR 2.12), con una frecuencia de 5,5% en los controles, incrementándose a 11,1% en los casos, mientras los haplotipos GCTG y TGG estuvieron asociados con resistencia al desarrollo de CCC (OR 0.59; OR 0.72 respectivamente), con frecuencias de 13% y 37% en los controles, descendiendo a 8,3% y 30% en los casos.

Tabla 4. Análisis del desequilibrio de ligamiento

| Haplotype | SNP | Gen | Bloque | Frecuencia | | OR (IC 95%) | P |
|-----------|------------|--------|--------|------------|-----------|------------------|-------|
| | | | | Casos | Controles | | |
| TGG | rs2070729 | IRF1 | 1 | 0.300 | 0.372 | 0.72 (0.53-0.98) | 0.039 |
| GAA | rs17622656 | | | 0.276 | 0.238 | | |
| TGA | rs9282763 | | | 0.234 | 0.250 | | |
| GGA | | | | 0.189 | 0.141 | | |
| ATTT | rs6882623 | CAMK2A | 3 | 0.497 | 0.513 | 0.59 (0.37-0.96) | 0.037 |
| ACCG | rs2241695 | | | 0.330 | 0.283 | | |
| GCTG | rs10051644 | | | 0.083 | 0.130 | | |
| ACTT | rs6885505 | | | 0.056 | 0.037 | | |
| ACTG | | | | 0.019 | 0.017 | | |
| TG | rs3822607 | CAMK2A | 4 | 0.548 | 0.604 | 2.12 (1.22-3.69) | 0.006 |
| CG | rs10066581 | | | 0.341 | 0.341 | | |
| CA | | | | 0.111 | 0.055 | | |

Figura 14. Asociación de Haplotipos



8. DISCUSION

En EC se acepta que la respuesta inmunológica y especialmente la inflamación crónica, cumplen un papel importante en la mediación del daño tisular en el corazón y otros órganos afectados (Dutra et al., 2009; Ferreira et al., 2003). Adicionalmente una característica de esta patología es la gran variabilidad en la forma clínica de presentación de la enfermedad y el grado de severidad de la misma. Se acepta que esta heterogeneidad depende de muchos factores, unos relacionados con el genoma del parásito y otros relacionados con la constitución genética del hospedero. En este sentido, la carga genética del hospedero podría estar cumpliendo un papel importante en la patogénesis de la enfermedad.

En EC se han adelantado estudios de asociación genética en genes que codifican moléculas relacionadas con el control de la respuesta inmune, entre ellos, aquellos involucrados con funciones de reconocimiento del parásito, citoquinas, quimiotaxis, factores de crecimiento, ligandos celulares, moléculas de adhesión, señalización intracelular y factores de transcripción (Calzada et al., 2009; Ramasawmy et al., 2008; Ramasawmy et al., 2007; Torres et al., 2009).

Es importante mencionar que en el caso de enfermedades complejas y poligénicas como es el caso de la EC, al igual que muchas enfermedades comunes, la identificación de genes relacionados con el desarrollo y severidad de la patología es difícil, por el hecho de que una variante no está determinando por sí sola el desarrollo de la enfermedad sino sólo está haciendo un aporte modesto a la misma. Por lo tanto, se hace necesario definir numerosas variantes en múltiples genes relacionadas con la patología. Para este tipo de enfermedades es ideal el rastreo genómico que evalúa todo el genoma ó el mapeo cromosómico que evalúa una región densa en SNPs para definir aquellas asociadas con la enfermedad, bajo la asunción de que si un polimorfismo de riesgo existe, éste será o bien

tipificado directamente o se encontrará en fuerte DL con otro de los presentes en la región analizada ^[20]. Dado el gran número de variantes genéticas presentes en el genoma y los posibles modelos de enfermedad, es probable que una variante (o grupos de variantes), sin que exista una hipótesis previa de gen candidato, esté asociada con el fenotipo, por esta razón, se requiere un tamaño de población mayor a estudiar y se deben hacer varias correcciones estadísticas para evitar resultados falsos positivos ^[6]. En este estudio aunque se aumentó considerablemente el tamaño de la muestra, éste continúa siendo uno de los aspectos a mejorar para obtener valores de asociación con mayor significancia que le den mayor solidez a los resultados.

Otro aspecto importante a tener en cuenta en los estudios de Genómica Humana es el diseño del estudio que puede ser poblacional o de familias y en los estudios poblacionales de casos y controles, como el empleado en este trabajo se hace imprescindible determinar que la población no esté estructurada para evitar falsos positivos. En nuestro estudio la población no mostró estructuración, presentando un F_{ST} de 0.012 que muestra que ambos grupos de pacientes pertenecen a una misma unidad genética poblacional.

Otro factor importante a considerar es la adecuada selección de los controles, en este estudio se seleccionaron de la misma zona tanto casos como controles para asegurar condiciones socioeconómicas similares (tipo de vivienda) y con iguales condiciones ambientales, especialmente aquellas relacionadas con exposición al vector y posibilidad de reinfección. Adicionalmente variables de confusión como edad y género fueron evitadas por la realización de correcciones por múltiples pruebas y regresión logística.

Como se describió en la sección de resultados de los 85 “tagSNPs” seleccionados y presentes en los genes *IL4*, *IL12B*, *IL13*, *IL5*, *CD74*, *TIMD4*, *C1QTNF2*, *IRF1*, *TFC7*, *ITK* y *CAMK2A*, se encontraron asociaciones estadísticamente

significativas con el desarrollo de CC en tres de ellos. Los SNPs rs10066581 y rs6882623 localizados en un intron y en la región 3'UTR del gen CAMK2A, respectivamente y el SNP rs2070729 ubicado en un intron del gen IRF1.

IRF-1 es un factor de transcripción cuyos productos juegan un rol crucial tanto en inmunidad innata como en adaptativa que regula la expresión de varios genes (Kroeger 2002). IRF-1 participa junto con IFN- γ en una serie de estímulos autocrinos que inducen y perpetúan la respuesta Th1 ^[55]. El alelo G del SNP rs2070729 encontrado con mayor frecuencia en el grupo de individuos con CCC, podría llevar a una producción aumentada de IRF-1, regulando la generación de una respuesta tipo Th1 y por consiguiente aumentando la producción de IFN- γ e iNOS y con ello el proceso inflamatorio característico de la CCC. Este resultado se corrobora con lo encontrado con el haplotipo TGG el cual está conformado por el alelo T de este polimorfismo y los alelos G del rs17622656 y el G del rs9282763 que están asociados con protección al desarrollo de CCC. Estos resultados estarían acordes con lo que se ha demostrado en pacientes con las formas más severas de EC quienes tienen una mayor expresión de IFN- γ y de TNF- α en sus tejidos ^[40]. Adicionalmente, estudios de expresión génica en modelos murinos analizando tejidos de miocardio con la forma crónica de EC, mostraron regulación positiva en genes relacionados con respuesta inmune, entre ellos genes inducidos por IFN- γ , como los factores reguladores de interferon *IRF1* e *IRF-2* y otras proteínas dependientes de interferon ^[24; 37; 60]. La expresión incrementada de *IRF1*, fue confirmada por PCR en tiempo real, la cual reveló un incremento del transcrito de 8 a 10 veces en animales infectados con *T. cruzi* comparado con controles inyectados con solución salina ^[24].

Estudios de mapeo fino de esta región en enfermedades como asma también detectaron asociación con variantes genéticas del gen *IRF1*. En estos estudios mediante análisis funcional de los polimorfismos presentes en la región promotora se detectaron cambios en su afinidad por el sitio de unión al ADN, regulando los

niveles totales de IgE. ^[61]. En artritis juvenil idiopática se encontró asociación de un polimorfismo presente en la región 3'UTR de *IRF1* con susceptibilidad, sugiriendo que esta asociación podría tener una contribución en el proceso crónico inflamatorio que subyace esta patología ^[25]. En el caso de cáncer cervical uterino polimorfismos en *IRF1* se encontraron asociados con riesgo incrementado de cáncer de cérvix en mujeres Coreanas ^[53]. Otros polimorfismos en *IRF1* se han estudiado en enfermedad celiaca ^[80], esclerosis múltiple ^[94] y en enfermedad de Graves ^[99], sin embargo no se encontraron asociaciones con ninguna de estas patologías.

Para poder determinar de manera precisa el papel de este polimorfismo en la patogénesis de la EC, se hace necesario adelantar estudios funcionales que determinen si regula los niveles de la proteína o su función relacionada con su afinidad por regiones promotoras. Esto sería fundamental dado que también se podría explicar este resultado con el hecho de que si el alelo G estuviera relacionado con menor expresión de *IRF1* esto podría correlacionarse con menor producción de iNOS y por lo tanto de ON, fundamental en el control de la parasitemia llevando a una persistencia del parásito que generaría inflamación crónica y el consecuente daño tisular (Gutierrez 2006).

El alelo A ($p=0,013$) del SNP rs10066581 ubicado en un intron del gen *CAMK2A* estuvo asociado con riesgo, esto se confirma con el hecho de que el haplotipo CA generado con los SNPs rs3822607 (C) y rs10066581 (A) también mostró asociación con susceptibilidad al desarrollo de CCC.

El significado biológico de *CAMK2* y sus diferentes subunidades no está completamente entendido ^[3], sin embargo, se sabe que juega un papel central en la fisiología y patología de los cardiomiocitos. Como es una serina/treonina quinasa multifuncional, *CAMK2* tiene ambos efectos de señalización a corto plazo para mantener acopladas la excitación y la contracción ^[42] y efectos a largo plazo sobre la transcripción en cardiomiocitos ^[82]. En pacientes con cardiomiopatía de

diferentes causas, se han evidenciado niveles incrementados de ARNm de CAMK2 (Hoch et al., 1999; Kirchhefer et al., 1999). En modelos murinos el infarto de miocardio (IM), se ha asociado con actividad incrementada de CAMK2. Los ratones afectados tuvieron significativamente alterado el manejo de Ca^{+2} y las propiedades de contracción/excitación; en contraste, la inhibición de CAMK2 preservó la función del miocardio. [29; 100; 102]. Estudios de expresión génica basados en microarreglos realizados por Singh y colaboradores, para identificar genes que estuvieran regulados por CAMK2 después de IM, mostraron que este gen reguló la expresión de genes proinflamatorios a través del factor nuclear kappa B (NF- κ B) mediada por receptores tipo toll (TLR). CAMK2 ha mostrado además promover una respuesta inflamatoria a través de la producción de citoquinas en macrófagos. El silenciamiento de *CAMK2A* por ARN interferente, disminuyó significativamente la producción de IL6, TNF- α e IFN- α/β en macrófagos peritoneales de ratones inducido con LPS [54].

Las asociaciones encontradas en este estudio podrían estar relacionadas con el papel que juega α -CAMK2 en la expresión de genes proinflamatorios como los mencionados anteriormente [54], con mayor relevancia en EC el gen *TNFA* como ha sido demostrado. Estudios previos reportaron presencia de niveles séricos elevados de TNF- α aún en individuos en fase indeterminada de la enfermedad (Ribeirao *et al.*, 2000; Abel *et al.*, 2001), sin embargo, estos niveles fueron mayores en pacientes con formas crónica y se relacionaron con severidad, porque los niveles fueron mayores en pacientes con reducción de más del 50% de la fracción de eyección ventricular izquierda (Ferreira 2003). La producción incrementada de esta citoquina proinflamatoria influenciada por α -CAMK2 podría llevar al establecimiento de una inflamación persistente y el consiguiente daño tisular a nivel cardiaco característico de CCC. Adicionalmente está demostrada la importancia de CAMK2 en la fisiología y patología del cardiomiocito, de tal forma que niveles elevados de esta proteína están asociados con daño celular [29; 102].

Los haplotipos generados con los polimorfismos del gen *CAMK2A* se encontraron distribuidos en dos bloques de DL, asociados diferencialmente con susceptibilidad o protección al desarrollo de CCC. Por una parte, el haplotipo CA conformado por los alelos de los SNPs rs3822607 y rs10066581 mencionado anteriormente y asociado con riesgo, en el cual uno de los alelos individuales también presentó asociación con susceptibilidad (A) y el haplotipo GCTG conformado por los alelos de los SNPs rs6882623, rs2241695, rs10051644, rs6885505 asociado con protección, en este caso el único alelo individual asociado con protección fue el alelo G del rs6882623. Estas asociaciones tanto con riesgo como con protección se explican por el hecho de que los haplotipos están formados por alelos pertenecientes a cada uno de los bloques de DL en que se encuentra dividido el gen. Este dato es interesante porque estaría demostrando la importancia de este gen en el desarrollo de la enfermedad. Hasta el momento no existen reportes de estudios de asociación de variantes genéticas en el gen *CAMK2A* en EC, ni tampoco otros estudios con la proteína, siendo este el primer hallazgo de su posible papel. Por lo tanto, con el fin de determinar si α -CAMK2 juega un rol en esta enfermedad, se hacen necesarios estudios sobre la actividad de esta proteína asociada al daño cardíaco asociado con la CCC, además de estudios funcionales de las variantes génicas identificadas con el fin de dilucidar los mecanismos de acción de esta proteína en la patogénesis de la EC.

El Grupo de inmunología y epidemiología molecular (GIEM) ha estudiado la influencia de SNPs en genes que codifican para citoquinas y otras proteínas del sistema inmune y su probable asociación con la patogénesis y especialmente con el proceso inflamatorio implicado en el desarrollo de la CCC; entre los genes estudiados se encuentra el gen *IL12B* que codifica para la subunidad p40 de IL-12. IL-12 es una citoquina inmunomoduladora que favorece la diferenciación de células T ayudadoras hacia la subpoblación Th1 estableciendo una unión entre la

respuesta innata y la inmunidad adaptativa e induce la producción de IFN- γ (Watford et al., 2003). En este estudio inicial se evidenció que la variante +1188 que mapea en la región 3'UTR estaba asociada con riesgo a desarrollar CCC por aumento en la producción de IL12 y posible alteración del balance Th1/Th2, con aumento de la expresión de INF- γ involucrado en la hipertrofia del cardiomiocito (Zafra et al., 2007). En el presente trabajo este polimorfismo no fue seleccionado como "tagSNP" porque se encontraba en total desequilibrio de ligamiento con otro, el cual fue genotipificado y no mostró asociación estadísticamente significativa ($p=0.66$). Este resultado que no replica la asociación determinada en el estudio previo podría estar relacionada con el hecho de que en el primer estudio se genotipificó un menor número de pacientes ($n=260$), comparado con este ($n=400$) conllevando a la pérdida de significancia de esta variante. En este sentido y a pesar de que los estudios de asociación pueden detectar asociaciones débiles como en este caso en que el alelo C mostró una p de 0,016; es necesario considerar que en estudios de casos y controles es de gran relevancia un tamaño de muestra elevado para evitar falsos positivos relacionados con bajo tamaño muestral. Sin embargo dada la importancia de esta citoquina en la patogénesis de la enfermedad sería importante validar los resultados en estudios independientes con otras poblaciones y analizar diferentes variantes de este gen antes de descartar su posible asociación con CCC.

9. CONCLUSIONES

Se identificaron 3 SNPs rs6882623 y rs10066581 ubicados en el gen *CAMK2A* y el SNP rs2070729 ubicado en el gen *IRF1* asociados con el desarrollo de CCC.

El alelo G del SNP rs2070729 en el gen *IRF1* 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, con lo cual se sugiere estaría asociado con el desarrollo de CCC.

El alelo A del SNP rs10066581 del gen *CAMK2A*, se encontró con una frecuencia mayor en los pacientes con CCC con diferencias estadísticamente significativas, sugiriendo efectos moderados asociados a susceptibilidad al desarrollo de CCC.

En el análisis de DL del loci mapeado se identificaron tres bloques de haplotipos que mostraron patrones sugestivos de asociación con riesgo y protección en el desarrollo de CCC.

Para el gen *CAMK2A* el haplotipo CA generado con los SNPs rs10066581 y rs3822607 mostró asociación con susceptibilidad al desarrollo de CCC, por lo tanto podría ser considerado un marcador de riesgo para el desarrollo de CCC en la población analizada; mientras el haplotipo GCTG conformado por los alelos de los SNPs rs6882623, rs2241695, rs10051644, rs6885505 está asociado con protección.

Para el gen *IRF1*, el haplotipo TGG el cual está conformado por los SNPs rs2020729, rs17622656 y rs9282763 estuvo asociado con protección al desarrollo de CCC, sugiriendo que este haplotipo actúa como un factor de protección para el desarrollo de CCC en la población analizada.

10. RECOMENDACIONES

Ampliar el número de muestra de la población para identificar asociaciones débiles y confirmar las obtenidas.

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

Hacer estudios funcionales de las variantes génicas asociadas para evidenciar cómo estos SNPs afectan la expresión ó función de la proteína y definir la forma como estarían involucradas en la patogénesis de la EC.

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

BIBLIOGRAFIA

1. ABEL, L. C., et al. Chronic Chagas' disease cardiomyopathy patients display an increased IFN-gamma response to *Trypanosoma cruzi* infection. En: J Autoimmun Aug, 2001, vol. 17, no. 1, p. 99-107.
2. AGUERO, F., et al. TcruziDB: an integrated, post-genomics community resource for *Trypanosoma cruzi*. En: Nucleic Acids Res Jan 1, 2006, vol. 34, no. Database issue, p. D428-31.
3. ANDERSON, M. E., BROWN, J. H., and BERS, D. M. CaMKII in myocardial hypertrophy and heart failure. En: Journal of molecular and cellular cardiology Oct, 2011, vol. 51, no. 4, p. 468-73.
4. AULCHENKO, Y. S., et al. Genetic variation in the KIF1B locus influences susceptibility to multiple sclerosis. En: Nature genetics Dec, 2008, vol. 40, no. 12, p. 1402-3.
5. BAKER, A. R., et al. Genetic susceptibility to tuberculosis associated with cathepsin Z haplotype in a Ugandan household contact study. En: Human immunology May, 2011, vol. 72, no. 5, p. 426-30.
6. BALDING, D. J. A tutorial on statistical methods for population association studies. En: Nature reviews. Genetics Oct, 2006, vol. 7, no. 10, p. 781-91.
7. BARBER, S. A., et al. Differential expression of interferon regulatory factor 1 (IRF-1), IRF-2, and interferon consensus sequence binding protein genes in lipopolysaccharide (LPS)-responsive and LPS-hyporesponsive macrophages. En: Infection and immunity Feb, 1995, vol. 63, no. 2, p. 601-8.
8. BARRETT, J. C., et al. Genome-wide association study and meta-analysis find that over 40 loci affect risk of type 1 diabetes. En: Nature genetics Jun, 2009, vol. 41, no. 6, p. 703-7.
9. BARRETT, J. C., et al. Haploview: analysis and visualization of LD and haplotype maps. En: Bioinformatics. 2005, vol. 21, no. 2, p. 263-265.
10. BAYER, K. U., et al. Developmental expression of the CaM kinase II isoforms: ubiquitous gamma- and delta-CaM kinase II are the early isoforms and most abundant in the developing nervous system. En: Brain research. Molecular brain research Jun 18, 1999, vol. 70, no. 1, p. 147-54.

11. BILATE, A. M., and CUNHA-NETO, E. Chagas disease cardiomyopathy: current concepts of an old disease. En: Revista do Instituto de Medicina Tropical de Sao Paulo Mar-Apr, 2008, vol. 50, no. 2, p. 67-74.
12. BOLDT, A. B., LUZ, P. R., and MESSIAS-REASON, I. J. MASP2 haplotypes are associated with high risk of cardiomyopathy in chronic Chagas disease. En: Clin Immunol Jul, 2011, vol. 140, no. 1, p. 63-70.
13. BOUATIA-NAJI, N., et al. A variant near MTNR1B is associated with increased fasting plasma glucose levels and type 2 diabetes risk. En: Nature genetics Jan, 2009, vol. 41, no. 1, p. 89-94.
14. CALZADA, J. E., et al. Transforming growth factor beta 1 (TGFbeta1) gene polymorphisms and Chagas disease susceptibility in Peruvian and Colombian patients. En: Cytokine Mar, 2009, vol. 45, no. 3, p. 149-53.
15. CAMPOS, M. A., and GAZZINELLI, R. T. Trypanosoma cruzi and its components as exogenous mediators of inflammation recognized through Toll-like receptors. En: Mediators Inflamm Jun, 2004, vol. 13, no. 3, p. 139-43.
16. CARLIER, Y. [Factors and mechanisms involved in the transmission and development of congenital infection with Trypanosoma cruzi]. En: Rev Soc Bras Med Trop 2005, vol. 38 Suppl 2, no., p. 105-7.
17. CASTELLUCCI, L., et al. FLI1 polymorphism affects susceptibility to cutaneous leishmaniasis in Brazil. En: Genes and immunity Oct, 2011, vol. 12, no. 7, p. 589-94.
18. COCCIA, E. M., et al. IFN-gamma and IL-4 differently regulate inducible NO synthase gene expression through IRF-1 modulation. En: International immunology Jul, 2000, vol. 12, no. 7, p. 977-85.
19. COELHO, P. S., et al. Glycosylphosphatidylinositol-anchored mucin-like glycoproteins isolated from Trypanosoma cruzi trypomastigotes induce in vivo leukocyte recruitment dependent on MCP-1 production by IFN-gamma-primed-macrophages. En: J Leukoc Biol May, 2002, vol. 71, no. 5, p. 837-44.
20. COLLINS, A. Allelic association: linkage disequilibrium structure and gene mapping. En: Molecular biotechnology Jan, 2009, vol. 41, no. 1, p. 83-9.

21. COURA, J. R. Chagas disease: what is known and what is needed--a background article. En: Mem Inst Oswaldo Cruz Oct 30, 2007, vol. 102 Suppl 1, no., p. 113-22.
22. COURA, J. R., and DIAS, J. C. Epidemiology, control and surveillance of Chagas disease: 100 years after its discovery. En: Mem Inst Oswaldo Cruz Jul, 2009, vol. 104 Suppl 1, no., p. 31-40.
23. CRUZ-ROBLES, D., et al. Association between IL-1B and IL-1RN gene polymorphisms and Chagas' disease development susceptibility. En: Immunol Invest 2009, vol. 38, no. 3-4, p. 231-9.
24. CHESSLER, A. D., et al. Trypanosoma cruzi triggers an early type I IFN response in vivo at the site of intradermal infection. En: J Immunol Feb 15, 2009, vol. 182, no. 4, p. 2288-96.
25. DONN, R. P., et al. Cytokine gene polymorphisms and susceptibility to juvenile idiopathic arthritis. British Paediatric Rheumatology Study Group. En: Arthritis and rheumatism Apr, 2001, vol. 44, no. 4, p. 802-10.
26. DRIGO, S. A., et al. Lack of association of tumor necrosis factor-alpha polymorphisms with Chagas disease in Brazilian patients. En: Immunol Lett Jan 15, 2007, vol. 108, no. 1, p. 109-11.
27. DUTRA, W. O., and GOLLOB, K. J. Current concepts in immunoregulation and pathology of human Chagas disease. En: Curr Opin Infect Dis Jun, 2008, vol. 21, no. 3, p. 287-92.
28. DUTRA, W. O., et al. Cellular and genetic mechanisms involved in the generation of protective and pathogenic immune responses in human Chagas disease. En: Mem Inst Oswaldo Cruz Jul, 2009, vol. 104 Suppl 1, no., p. 208-18.
29. ERICKSON, J. R., and ANDERSON, M. E. CaMKII and its role in cardiac arrhythmia. En: Journal of cardiovascular electrophysiology Dec, 2008, vol. 19, no. 12, p. 1332-6.
30. FERREIRA, R. C., et al. Increased plasma levels of tumor necrosis factor-alpha in asymptomatic/"indeterminate" and Chagas disease cardiomyopathy patients. En: Mem Inst Oswaldo Cruz Apr, 2003, vol. 98, no. 3, p. 407-11.
31. FLOREZ, O., MARTIN, J., and GONZALEZ, C. I. Interleukin 4, interleukin 4 receptor-alpha and interleukin 10 gene polymorphisms in Chagas disease. En: Parasite Immunol Sep, 2011, vol. 33, no. 9, p. 506-11.

32. FLOREZ, O., et al. Interleukin-1 gene cluster polymorphism in chagas disease in a Colombian case-control study. En: Hum Immunol Sep, 2006, vol. 67, no. 9, p. 741-8.
33. FRANKE, A., et al. Genome-wide meta-analysis increases to 71 the number of confirmed Crohn's disease susceptibility loci. En: Nature genetics Dec, 2010, vol. 42, no. 12, p. 1118-25.
34. FRAYLING, T. M. Genome-wide association studies provide new insights into type 2 diabetes aetiology. En: Nature reviews. Genetics Sep, 2007, vol. 8, no. 9, p. 657-62.
35. FRAZER, K. A., et al. Human genetic variation and its contribution to complex traits. En: Nat Rev Genet Apr, 2009, vol. 10, no. 4, p. 241-51.
36. GALON, J., et al. IL-12 induces IFN regulating factor-1 (IRF-1) gene expression in human NK and T cells. En: Journal of immunology Jun 15, 1999, vol. 162, no. 12, p. 7256-62.
37. GARG, N., POPOV, V. L., and PAPACONSTANTINO, J. Profiling gene transcription reveals a deficiency of mitochondrial oxidative phosphorylation in Trypanosoma cruzi-infected murine hearts: implications in chagasic myocarditis development. En: Biochim Biophys Acta Jul 14, 2003, vol. 1638, no. 2, p. 106-20.
38. GAZZINELLI, R. T., and DENKERS, E. Y. Protozoan encounters with Toll-like receptor signalling pathways: implications for host parasitism. En: Nature reviews. Immunology Dec, 2006, vol. 6, no. 12, p. 895-906.
39. GIANNOULI, S., et al. Autoimmune manifestations in human myelodysplasia: a positive correlation with interferon regulatory factor-1 (IRF-1) expression. En: Annals of the rheumatic diseases May, 2004, vol. 63, no. 5, p. 578-82.
40. GOMES, J. A., et al. Evidence that development of severe cardiomyopathy in human Chagas' disease is due to a Th1-specific immune response. En: Infection and immunity Mar, 2003, vol. 71, no. 3, p. 1185-93.
41. GRAEFE, S. E., et al. Genes from Chagas susceptibility loci that are differentially expressed in T. cruzi-resistant mice are candidates accounting for impaired immunity. En: PLoS One 2006, vol. 1, no., p. e57.
42. GRIMM, M., and BROWN, J. H. Beta-adrenergic receptor signaling in the heart: role of CaMKII. En: Journal of molecular and cellular cardiology Feb, 2010, vol. 48, no. 2, p. 322-30.

43. HINDORFF, L. A., et al. Potential etiologic and functional implications of genome-wide association loci for human diseases and traits. En: Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America Jun 9, 2009, vol. 106, no. 23, p. 9362-7.
44. HUDMON, A., and SCHULMAN, H. Structure-function of the multifunctional Ca²⁺/calmodulin-dependent protein kinase II. En: The Biochemical journal Jun 15, 2002, vol. 364, no. Pt 3, p. 593-611.
45. HUGHES, T., et al. Fine-mapping and transethnic genotyping establish IL2/IL21 genetic association with lupus and localize this genetic effect to IL21. En: Arthritis and rheumatism Jun, 2011, vol. 63, no. 6, p. 1689-97.
46. IMANISHI, D., et al. Identification of a novel cytokine response element in the human IFN regulatory factor-1 gene promoter. En: Journal of immunology Oct 1, 2000, vol. 165, no. 7, p. 3907-16.
47. JAKKULA, E., et al. Genome-wide association study in a high-risk isolate for multiple sclerosis reveals associated variants in STAT3 gene. En: American journal of human genetics Feb 12, 2010, vol. 86, no. 2, p. 285-91.
48. JALLOW, M., et al. Genome-wide and fine-resolution association analysis of malaria in West Africa. En: Nat Genet Jun, 2009, vol. 41, no. 6, p. 657-65.
49. JIAN, X. Q., et al. Association of ADAM10 and CAMK2A polymorphisms with conduct disorder: evidence from family-based studies. En: Journal of abnormal child psychology Aug, 2011, vol. 39, no. 6, p. 773-82.
50. JUNQUEIRA, C., et al. The endless race between Trypanosoma cruzi and host immunity: lessons for and beyond Chagas disease. En: Expert Rev Mol Med 2010, vol. 12, no., p. e29.
51. KAMIJO, R., et al. Requirement for transcription factor IRF-1 in NO synthase induction in macrophages. En: Science Mar 18, 1994, vol. 263, no. 5153, p. 1612-5.
52. KROGER, A., et al. Activities of IRF-1. En: Journal of interferon & cytokine research : the official journal of the International Society for Interferon and Cytokine Research Jan, 2002, vol. 22, no. 1, p. 5-14.

53. LEE, J. E., et al. Gene-gene and gene-environmental interactions of p53, p21, and IRF-1 polymorphisms in Korean women with cervix cancer. En: International journal of gynecological cancer : official journal of the International Gynecological Cancer Society Jan-Feb, 2004, vol. 14, no. 1, p. 118-25.
54. LIU, X., et al. CaMKII promotes TLR-triggered proinflammatory cytokine and type I interferon production by directly binding and activating TAK1 and IRF3 in macrophages. En: Blood Dec 15, 2008, vol. 112, no. 13, p. 4961-70.
55. LOHOFF, M., and MAK, T. W. Roles of interferon-regulatory factors in T-helper-cell differentiation. En: Nature reviews. Immunology Feb, 2005, vol. 5, no. 2, p. 125-35.
56. MILLER, S. A., DYKES, D. D., and POLESKY, H. F. A simple salting out procedure for extracting DNA from human nucleated cells. En: Nucleic acids research Feb 11, 1988, vol. 16, no. 3, p. 1215.
57. 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 Jul, 2003, vol. 98, no. 5, p. 577-91.
58. MONCAYO, A., and SILVEIRA, A. C. Current epidemiological trends for Chagas disease in Latin America and future challenges in epidemiology, surveillance and health policy. En: Mem Inst Oswaldo Cruz Jul, 2009, vol. 104 Suppl 1, no., p. 17-30.
59. MORAHAN, G., et al. Association of variants in the IL12B gene with leprosy and tuberculosis. En: Tissue Antigens Apr, 2007, vol. 69 Suppl 1, no., p. 234-6.
60. MUKHERJEE, S., et al. Alterations in myocardial gene expression associated with experimental Trypanosoma cruzi infection. En: Genomics May, 2008, vol. 91, no. 5, p. 423-32.
61. NAKAO, F., et al. Association of IFN-gamma and IFN regulatory factor 1 polymorphisms with childhood atopic asthma. En: The Journal of allergy and clinical immunology Mar, 2001, vol. 107, no. 3, p. 499-504.
62. NEGISHI, H., et al. Evidence for licensing of IFN-gamma-induced IFN regulatory factor 1 transcription factor by MyD88 in Toll-like receptor-dependent gene induction program. En: Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America Oct 10, 2006, vol. 103, no. 41, p. 15136-41.

63. NIETO, A., et al. HLA haplotypes are associated with differential susceptibility to *Trypanosoma cruzi* infection. En: *Tissue Antigens* Mar, 2000, vol. 55, no. 3, p. 195-8.
64. OPS
2006 Organización Panamericana de la Salud. Estimación cuantitativa de la Enfermedad de Chagas en las Américas. Pp. 17-20. Buenos Aires, Argentina.
65. PALMER, L. J., and CARDON, L. R. Shaking the tree: mapping complex disease genes with linkage disequilibrium. En: *Lancet* Oct 1, 2005, vol. 366, no. 9492, p. 1223-34.
66. PAUN, A., and PITHA, P. M. The IRF family, revisited. En: *Biochimie* Jun-Jul, 2007, vol. 89, no. 6-7, p. 744-53.
67. PETROVSKI, S., et al. Common human genetic variants and HIV-1 susceptibility: a genome-wide survey in a homogeneous African population. En: *AIDS* Feb 20, 2011, vol. 25, no. 4, p. 513-8.
68. PRITCHARD, J. K., STEPHENS, M., and DONNELLY, P. Inference of population structure using multilocus genotype data. En: *Genetics* Jun, 2000, vol. 155, no. 2, p. 945-59.
69. PURCELL, S., et al. PLINK: a tool set for whole-genome association and population-based linkage analyses. En: *American Journal of Human Genetics* Sep, 2007, vol. 81, no. 3, p. 559-75.
70. RAMASAWMY, R., et al. Variants in the promoter region of IKBL/NFKBIL1 gene may mark susceptibility to the development of chronic Chagas' cardiomyopathy among *Trypanosoma cruzi*-infected individuals. En: *Mol Immunol* Jan, 2008, vol. 45, no. 1, p. 283-8.
71. RASSI, A., JR., RASSI, A., and MARIN-NETO, J. A. Chagas disease. En: *Lancet* Apr 17, 2010, vol. 375, no. 9723, p. 1388-402.
72. RASSI, A., JR., RASSI, A., and RASSI, S. G. Predictors of mortality in chronic Chagas disease: a systematic review of observational studies. En: *Circulation* Mar 6, 2007, vol. 115, no. 9, p. 1101-8.
73. REILLY, C. M., et al. Interferon regulatory factor-1 gene deletion decreases glomerulonephritis in MRL/lpr mice. En: *European journal of immunology* May, 2006, vol. 36, no. 5, p. 1296-308.
74. RELLOS, P., et al. Structure of the CaMKII δ /calmodulin complex reveals the molecular mechanism of CaMKII kinase activation. En: *PLoS biology* 2010, vol. 8, no. 7, p. e1000426.

75. RIBEIRAO, M., et al. Chagasic patients develop a type 1 immune response to Trypanosoma cruzi trans-sialidase. En: Parasite Immunol Jan, 2000, vol. 22, no. 1, p. 49-53.
76. ROCHA, M. O., TEIXEIRA, M. M., and RIBEIRO, A. L. An update on the management of Chagas cardiomyopathy. En: Expert Rev Anti Infect Ther Aug, 2007, vol. 5, no. 4, p. 727-43.
77. SAKUNTABHAI, A., et al. Genetic determination and linkage mapping of Plasmodium falciparum malaria related traits in Senegal. En: PLoS One 2008, vol. 3, no. 4, p. e2000.
78. SAVINO, W., et al. Cytokines and cell adhesion receptors in the regulation of immunity to Trypanosoma cruzi. En: Cytokine Growth Factor Rev Feb-Apr, 2007, vol. 18, no. 1-2, p. 107-24.
79. SCHMUNIS, G. A. Epidemiology of Chagas disease in non-endemic countries: the role of international migration. En: Mem Inst Oswaldo Cruz Oct 30, 2007, vol. 102 Suppl 1, no., p. 75-85.
80. SEEGER, D., et al. IL12B and IRF1 gene polymorphisms and susceptibility to celiac disease. En: European journal of immunogenetics : official journal of the British Society for Histocompatibility and Immunogenetics Dec, 2003, vol. 30, no. 6, p. 421-5.
81. SENALDI, G., et al. Protection against the mortality associated with disease models mediated by TNF and IFN-gamma in mice lacking IFN regulatory factor-1. En: Journal of immunology Dec 15, 1999, vol. 163, no. 12, p. 6820-6.
82. SINGH, M. V., et al. Ca²⁺/calmodulin-dependent kinase II triggers cell membrane injury by inducing complement factor B gene expression in the mouse heart. En: The Journal of clinical investigation Apr, 2009, vol. 119, no. 4, p. 986-96.
83. SODERLING, T. R., and STULL, J. T. Structure and regulation of calcium/calmodulin-dependent protein kinases. En: Chemical reviews Aug, 2001, vol. 101, no. 8, p. 2341-52.
84. SOUZA, P. E., et al. Monocytes from patients with indeterminate and cardiac forms of Chagas' disease display distinct phenotypic and functional characteristics associated with morbidity. En: Infect Immun Sep, 2004, vol. 72, no. 9, p. 5283-91.
85. STAHL, E. A., et al. Genome-wide association study meta-analysis identifies seven new rheumatoid arthritis risk loci. En: Nature genetics Jun, 2010, vol. 42, no. 6, p. 508-14.

86. SUGAI, R., et al. Molecular cloning of a novel protein containing the association domain of calmodulin-dependent protein kinase II. En: Journal of biochemistry Oct, 1996, vol. 120, no. 4, p. 773-9.
87. TAKEUCHI, M., and FUJISAWA, H. Perinuclear membrane localization of alphaKAP, a protein produced from a gene within the gene of calmodulin-dependent protein kinase IIalpha. En: Journal of biochemistry Sep, 1997, vol. 122, no. 3, p. 494-7.
88. TALVANI, A., et al. Cyclic AMP decreases the production of NO and CCL2 by macrophages stimulated with Trypanosoma cruzi GPI-mucins. En: Parasitol Res Apr, 2009, vol. 104, no. 5, p. 1141-8.
89. TALVANI, A., et al. Chemokine receptor expression on the surface of peripheral blood mononuclear cells in Chagas disease. En: The Journal of infectious diseases Jan 15, 2004, vol. 189, no. 2, p. 214-20.
90. TARLETON, R. L. Immune system recognition of Trypanosoma cruzi. En: Curr Opin Immunol Aug, 2007, vol. 19, no. 4, p. 430-4.
91. THOMPSON, D., et al. Haplotype tagging single nucleotide polymorphisms and association studies. En: Human heredity 2003, vol. 56, no. 1-3, p. 48-55.
92. TORRES, O. A., et al. Association of the macrophage migration inhibitory factor -173G/C polymorphism with Chagas disease. En: Hum Immunol Jul, 2009, vol. 70, no. 7, p. 543-6.
93. TORRICO, F., et al. [Endemic level of congenital Trypanosoma cruzi infection in the areas of maternal residence and the development of congenital Chagas disease in Bolivia]. En: Rev Soc Bras Med Trop 2005, vol. 38 Suppl 2, no., p. 17-20.
94. VANDENBROECK, K., et al. Lack of association between the interferon regulatory factor-1 (IRF1) locus at 5q31.1 and multiple sclerosis in Germany, northern Italy, Sardinia and Sweden. En: Genes and immunity 2000, vol. 1, no. 4, p. 290-2.
95. VITELLI-AVELAR, D. M., et al. Non-conventional flow cytometry approaches to detect anti-Trypanosoma cruzi immunoglobulin G in the clinical laboratory. En: J Immunol Methods Jan 10, 2007, vol. 318, no. 1-2, p. 102-12.

96. WRIGHTSMAN, R., KRASSNER, S., and WATSON, J. Genetic control of responses to *Trypanosoma cruzi* in mice: multiple genes influencing parasitemia and survival. En: Infect Immun May, 1982, vol. 36, no. 2, p. 637-44.
97. WRIGHTSMAN, R. A., et al. Role of the H-2s haplotype in survival of mice after infection with *Trypanosoma cruzi*. En: Infect Immun May, 1984, vol. 44, no. 2, p. 351-4.
98. XAVIER, R. J., and RIOUX, J. D. Genome-wide association studies: a new window into immune-mediated diseases. En: Nature reviews. Immunology Aug, 2008, vol. 8, no. 8, p. 631-43.
99. YANG, Y., et al. Association study between the IL4, IL13, IRF1 and UGRP1 genes in chromosomal 5q31 region and Chinese Graves' disease. En: Journal of human genetics 2005, vol. 50, no. 11, p. 574-82.
100. YANG, Y., et al. Calmodulin kinase II inhibition protects against myocardial cell apoptosis in vivo. En: American journal of physiology. Heart and circulatory physiology Dec, 2006, vol. 291, no. 6, p. H3065-75.
101. ZAFRA, G., et al. Polymorphism in the 3' UTR of the IL12B gene is associated with Chagas' disease cardiomyopathy. En: Microbes Infect Jul, 2007, vol. 9, no. 9, p. 1049-52.
102. ZHANG, R., et al. Calmodulin kinase II inhibition protects against structural heart disease. En: Nature medicine Apr, 2005, vol. 11, no. 4, p. 409-17.

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