

**VARIANTES GENETICAS PRESENTES EN EL GEN CCR5 Y SU PAPEL EN EL
DESARROLLO DE LA CARDIOMIOPATIA CHAGASICA
EN SANTANDER - COLOMBIA**

ANA DORIS GOMEZ GRANADOS

**UNIVERSIDAD INDUSTRIAL DE SANTANDER
FACULTAD DE SALUD
DEPARTAMENTO DE CIENCIAS BÁSICAS
ESCUELA DE BACTERIOLOGIA Y LABORATORIO CLINICO
BUCARAMANGA
2012**

**VARIANTES GENETICAS PRESENTES EN EL GEN CCR5 Y SU PAPEL EN EL
DESARROLLO DE LA CARDIOMIOPATIA CHAGASICA
EN SANTANDER - COLOMBIA**

ANA DORIS GOMEZ GRANADOS

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
ESCUELA DE BACTERIOLOGIA Y LABORATORIO CLINICO
BUCARAMANGA
2012**

CONTENIDO

	Pág.
INTRODUCCIÓN	17
1. LA ENFERMEDAD DE CHAGAS	20
1.1 AGENTE ETIOLÓGICO DE LA ENFERMEDAD DE CHAGAS	20
1.1.1 Ciclo de vida de <i>Trypanosoma cruzi</i>	22
1.2 EL VECTOR DE LA ENFERMEDAD DE CHAGAS	23
1.3. EPIDEMIOLOGÍA DE LA ENFERMEDAD DE CHAGAS	24
1.3.1 Mecanismos de transmisión	28
1.3.1.1 Vectorial	28
1.3.1.2 Transfusional	28
1.3.1.3 Congénita	28
1.3.1.4 Oral	28
1.3.1.5 Accidental	28
1.4 ASPECTOS CLÍNICOS DE LA ENFERMEDAD	28
1.4.1 Fase Aguda	29
1.4.2 Fase Crónica	30
2. INTERACCIÓN DE <i>Trypanosoma cruzi</i> CON EL HOSPEDERO HUMANO	33
2.1 ASPECTOS INMUNOLÓGICOS	33
2.1.1 Inmunidad Innata	34
2.1.2 Inmunidad Adaptativa	35

2.1.3 Importancia de la inflamación en la CCC	36
3. ASPECTOS GENÉTICOS Y BIOQUÍMICOS	38
3.1 CCR5	42
3.1.1 Estructura proteica de CCR5	42
3.1.2 Función	43
3.1.2.1 CCR5 en enfermedad de Chagas	45
3.1.3 Estructura del gen <i>CCR5</i>	46
3.1.3.1 Polimorfismos del gen <i>CCR5</i>	47
3.1.3.2 Enfermedades asociadas con polimorfismos en <i>CCR5</i>	50
4. JUSTIFICACIÓN	53
5. OBJETIVOS	55
5.1 OBJETIVO GENERAL	55
5.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	55
6. MATERIALES Y METODOS	56
6.1 POBLACIÓN DE ESTUDIO	56
6.2 CRITERIOS DE INCLUSIÓN Y EXCLUSIÓN PARA EL GRUPO DE CASOS	58
6.2.1 Criterios de Inclusión	58
6.2.2 Criterios de Exclusión	58
6.3 CRITERIOS DE INCLUSIÓN PARA EL GRUPO CONTROL	58
6.3.1 Criterios de Inclusión	58

6.4 SELECCIÓN DE LOS POLIMORFISMOS	59
6.5 GENOTIPIFICACIÓN DE POLIMORFISMOS	59
6.6 ANÁLISIS ESTADÍSTICO	60
6.7 CONSIDERACIONES ETICAS	61
7. RESULTADOS	62
7.1 ANÁLISIS DE LA POBLACIÓN	62
7.1.1 Variables del estudio	62
7.1.1.1 Variables demográficas	62
7.1.1.2 Variables serológicas	62
7.1.1.3 Variables clínicas	63
7.1.1.4 Estructura poblacional	63
7.1.1.5 Equilibrio de Hardy-Weinberg	64
7.2 ANÁLISIS DE ASOCIACION ALÉLICA Y GENOTÍPICA	64
7.3 ANÁLISIS DE DESEQUILIBRIO DE LIGAMIENTO	67
8. DISCUSIÓN	69
9. CONCLUSIÓN	74
10. RECOMENDACIONES	76
BIBLIOGRAFIA	77
ANEXOS	89

LISTA DE TABLAS

	Pág.
Tabla 1. Polimorfismos genéticos estudiados en el hospedero en la enfermedad de Chagas.	41
Tabla 2. Receptores de quimiocinas CC y sus ligandos	42
Tabla 3. Clasificación de los pacientes según grados de severidad de la cardiopatía - OMS	57
Tabla 4. Características demográficas de la población de estudio	62
Tabla 5. Población de estudio según la gravedad de la cardiopatía chagásica	63
Tabla 6. Frecuencias alélicas y genotípicas de los SNPs del gen <i>CCR5</i> en pacientes asintomáticos y con cardiomiopatía chagásica	65
Tabla 7. Frecuencias alélicas y genotípicas de los SNPs del gen <i>CCR5</i> en pacientes con cardiomiopatía chagásica y grados de severidad	66
Tabla 8. Análisis de haplotipos en pacientes asintomáticos y con CCC	68
Tabla 9. Análisis de haplotipos en pacientes con CCC y diferentes grados de severidad	68

LISTA FIGURAS

	Pág.
Figura 1. Estadios de <i>Trypanosoma cruzi</i>	21
Figura 2. Ciclo de vida de <i>Trypanosoma cruzi</i>	23
Figura 3. Distribución geográfica de triatomíneos en Colombia	24
Figura 4. Número estimado de emigrantes con <i>T. cruzi</i> viviendo en países no endémicos	25
Figura 5. Mapa de riesgo de transmisión de la enfermedad de Chagas	26
Figura 6. Mapa de Santander. Incidencia de Chagas por provincias. Año 2006	27
Figura 7. Evolución clínica de la enfermedad de Chagas (EC)	29
Figura 8. Dinámica de la parasitemia y respuesta inmune humoral en fase aguda y crónica de la enfermedad de Chagas	30
Figura 9. Citocinas y poblaciones celulares involucradas en la EC	34
Figura 10. Estructura de la variación genética del DNA en el genoma humano	39
Figura 11. Estructura protéica de CCR5	43
Figura 12. Vías de señalización del receptor CCR5	44
Figura 13. Estructura y polimorfismo del gen <i>CCR5</i>	47
Figura 14. Receptores de quimiocinas y enfermedad	50
Figura 15. Ensayo de genotipificación de SNPs	60
Figura 16. Desequilibrio de ligamiento de la región 3p21.31 correspondiente al gen <i>CCR5</i>	67

LISTA ANEXOS

ANEXO A. Declaratoria de consentimiento informado	89
---	----

GLOSARIO

Alelo: Una de las formas variantes de un gen en un locus o de un marcador particular en un cromosoma. Diferentes alelos de un gen producen variaciones en las características hereditarias tales como el color del cabello o el tipo de sangre.

Antígeno: Es una sustancia que desencadena la formación de anticuerpos y puede generar una respuesta inmunitaria. La definición moderna abarca todas las sustancias que pueden ser reconocidas por el sistema inmune, bien sean propias o ajenas.

ADN: ácido desoxirribonucleico es una molécula de doble hélice responsable de la transmisión hereditaria porque lleva las instrucciones genéticas para el desarrollo y funcionamiento de todos los organismos vivos conocidos y algunos virus.

Asociación genética. Término utilizado para describir los estudios dirigidos a determinar la asociación del genotipo con el fenotipo, especialmente relacionados con el desarrollo de enfermedades.

CMH: El complejo mayor de histocompatibilidad (CMH o MHC), es un complejo de genes que codifican las moléculas de la superficie celular que son necesarias para la presentación de los antígenos a los linfocitos T y participan en los procesos de rechazo de tejidos y órganos.

Deleción: Una variante estructural del ADN que consiste en la pérdida de un fragmento de ADN de un cromosoma. La deleción de un gen o de parte de un gen puede ocasionar una enfermedad o una anomalía.

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

Exones: Las regiones de un gen que contiene la información para producir la proteína del gen. Cada exón codifica una porción específica de la proteína completa. En eucariotas los exones de un gen se separan por regiones largas de ADN (llamadas intrones) que no codifican.

Haplotipo: En genética es una combinación de alelos de diferentes loci de un cromosoma que son transmitidos juntos. Un haplotipo es un conjunto de polimorfismos de un solo nucleótido (SNPs) en un cromosoma particular que están asociados.

Intrón: Es una secuencia no codificadora de ADN que separa a dos exones. El intrón inicialmente se transcribe en la molécula de ARN mensajero pero después es eliminado durante el proceso de maduración del ARN.

Locus: El lugar del cromosoma donde está localizado un gen específico, es la posición física del gen. El plural es "loci".

Receptor: Los receptores son moléculas cuya función es la de reconocer y ser capaces de unirse a moléculas que provienen del exterior celular con el fin de generar una señalización interna y finalmente una respuesta (efecto). Por lo general, los receptores tienen una naturaleza glucoprotéica.

RESUMEN

TITULO*: VARIANTES GENETICAS PRESENTES EN EL GEN *CCR5* Y SU PAPEL EN EL DESARROLLO DE LA CARDIOMIOPATIA CHAGASICA EN SANTANDER – COLOMBIA

AUTORES:** GOMEZ GRANADOS Ana Doris; GONZALEZ RUGELES, Clara Isabel

PALABRAS CLAVES: Gen *CCR5*, Cardiomiopatía Chagásica

DESCRIPCIÓN

La enfermedad de Chagas (EC) representa un problema de salud pública en América Latina. El 30% de los individuos infectados desarrollan cardiomiopatía chagásica crónica (CCC), mientras que el porcentaje restante permanece asintomático; este hecho sugiere una susceptibilidad genética diferencial. La EC es considerada una enfermedad compleja y multifactorial. Las quimiocinas y sus receptores son fundamentales en procesos de migración celular que se dan durante un proceso inflamatorio, variantes del receptor de quimiocinas *CCR5* y la quimiocina *CCL5* han sido asociados en el desarrollo de la CCC, tanto en población del departamento de Santander, Colombia como en otras poblaciones. Por lo tanto, el presente estudio plantea el análisis en un número mayor de individuos de siete variantes presentes en el gen *CCR5* que permitan confirmar los resultados previos involucrados en el desarrollo de la CCC.

Objetivo Determinar la asociación entre las variantes génicas rs2856758, rs2734648, rs1799987, rs1799988, rs41469351, rs1800023, rs1800024 presentes en el gen *CCR5* y sus haplotipos con el desarrollo de CCC en individuos provenientes de zona endémica de Santander, Colombia.

Metodología Se utilizó un estudio de casos y controles donde se evaluaron las frecuencias alélicas y genotípicas de los polimorfismos del gen *CCR5*, en pacientes seropositivos con CCC (casos236) y pacientes seropositivos asintomáticos (controles206). La genotipificación se realizó mediante RT-PCR utilizando sondas Taq-Man (AppliedBiosystems). Los datos se analizaron utilizando PLINK y Haploview 4.2.

Resultados No se encontraron diferencias estadísticamente significativas entre casos y controles, sin embargo los genotipos rs1799987 ($p=0.033$; $OR=1.76(1.01-3.05)$), rs1799988 ($p=0.014$; $OR=1.91(1.1-3.33)$) y el rs1800023 ($p=0.008$; $OR=2.02(1.16-3.53)$), estuvieron asociados con severidad en el desarrollo de la CCC. En los haplotipos no se encontraron diferencias significativas.

Conclusión Nuestros datos sugieren que las variantes genéticas del gen *CCR5* analizadas no tienen asociación con el desarrollo de la CCC pero sí con la severidad, en la población de estudio.

* Proyecto de grado

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

ABSTRACT

Title*: GENETIC VARIANTS IN THE CCR5 GENE AND THEIR ROLE IN THE DEVELOPMENT OF CHAGASIC CARDIOMYOPATHY IN SANTANDER - COLUMBIA

AUTHORS:** GOMEZ GRANADOS Ana Doris; GONZALEZ RUGELES, Clara Isabel

KEYWORDS: CCR5 gene, chagasic cardiomyopathy

DESCRIPTION

Chagas' disease (CD) represents a public health issue in Latin America. While most patients remain asymptomatic, 30% of the infected individuals develop chronic chagasic cardiomyopathy (CCC), suggesting a differential genetic susceptibility, that has been studied in various populations. The CD is considered a complex and multifactorial disease. Chemokines and their receptors are involved in the inflammatory process due to their role in cell migration. In CD, variants of the chemokine receptor CCR5 and CCL5 chemokine have been involved in the development of CCC in populations of Santander, Colombia and others populations. Thus, the present study aims to analyze in a large cohort of individuals seven variants of the CCR5 gene that will enable us to define regions and haplotypes involved in the development of CCC.

Objective To determine the association between the genetic variants rs2856758, rs2734648, rs1799987, rs1799988, rs41469351, rs1800023, rs1800024 of the CCR5 gene and its haplotypes with the development of CCC in individuals from the endemic zone of Santander, Colombia.

Methodology A case/control study was performed to evaluate the allelic and genotypic frequencies of the CCR5 gene polymorphisms in seropositive patients with CCC (cases 236) and seropositives asymptomatic patients (controls 206). Genotyping was done using RT-PCR using Taq-Man probes (Applied Biosystems). Data was analyzed using PLINK and Haploview 4.2.

Results No statistical significant differences were found when the allelic and genotypic frequencies were compared. However, the rs1799987 ($p=0.033$; $OR=1.76(1.01-3.05)$), rs1799988 ($p=0.014$; $OR=1.91(1.1-3.33)$) y el rs1800023 ($p=0.008$; $OR=2.02(1.16-3.53)$), genotypes were found to be associated with severity in the development of CCC. No significant differences were found in the case of the haplotypes.

Conclusions Our data analysis suggests that the genetic variants of the CCR5 gene are not associated with the development of Chagasic cardiomyopathy in the studied population, however, association was found with the severity of the disease.

* Work Degree

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

INTRODUCCION

La Enfermedad de Chagas (EC) es una condición que en su etapa aguda o crónica puede causar una Cardiopatía Chagásica Crónica (CCC), la cual es un problema de alto impacto en la salud pública de Colombia y Latino América. La Organización Mundial de la Salud (OMS) reportó para el año 2006 un número de 12.500 muertes con 41.200 nuevos casos anuales en 21 países de Latino América (WHO, 2007). Esta enfermedad se ha extendido al resto del mundo, por la migración de personas infectadas que sirven como donadores para trasplantes y transfusiones sanguíneas. La infección por *Trypanosoma cruzi* (*T. cruzi*) en su fase inicial cursa con una fase aguda generalmente asintomática y cerca de un 5% de las personas infectadas puede llegar a desarrollar una cardiopatía chagásica aguda e incluso llevarlos a la muerte. La mayoría de los individuos infectados una vez superada esta fase inicial evolucionan a la forma indeterminada o asintomática por tiempo indefinido o incluso por el resto de sus vidas, pero un 30% después de 10 a 30 años de la infección desarrollan la forma crónica de la enfermedad.

Está aceptado que la respuesta inmune tiene un papel central en la patogenia de la enfermedad, en donde la presencia de antígenos de *T. cruzi* que no pudieron ser eliminados totalmente inducen un proceso inflamatorio crónico con el consecuente daño tisular, fibrosis y disfunción cardíaca (Bilate MB, et al, 2003). Las reacciones inflamatorias observadas, tanto durante la fase aguda como la fase crónica de la EC, desempeñan un papel importante en su patogenia. Una vez se produce la infección inicial, la respuesta inmune innata promueve la fagocitosis del parásito por macrófagos durante la fase aguda de la infección, permitiendo su control pero no su erradicación (Bilate MB, et al, 2008; Maya JD, et al, 2010). En la respuesta inmune adaptativa los linfocitos T CD4+ y CD8+ son expuestos a antígenos del parásito, generando la respuesta efectora y de memoria. La respuesta celular es predominantemente de tipo Th1, caracterizada por niveles

elevados de interferón gamma (IFN- γ), interleuquina-12 (IL-12) y TNF-alfa (TNF- α) con la consecuente activación de linfocitos T CD8+ (Dutra WO, et al 2009).

En los procesos de migración celular hacia los tejidos participan un grupo de proteínas denominadas quimiocinas y sus receptores. El receptor de quimiocinas cinco (CCR5) es altamente expresado por linfocitos Th1 en los tejidos comprometidos, promoviendo la migración celular, inflamación y daño tisular. Diversos estudios en CCC han mostrado que la sobre-expresión del receptor de quimiocinas CCR5, juega un rol muy importante en el control de la infección por la migración de leucocitos hacia los tejidos infectados (Gomes, et al, 2005. Araujo et al, 2007). Además se ha observado que niveles de expresión del RNAm de CCR5 son significativamente más altos en el tejido miocárdico de pacientes con CCC que en pacientes con cardiomiopatía de etiología no inflamatoria (Nogueira LG, et al, 2012).

La complejidad de la respuesta generada, los procesos de regulación y su variación, asociado a que sólo aproximadamente 30% de los pacientes infectados por *T. cruzi* desarrollan CCC, sugieren que el componente genético está involucrado en su patogénesis (Billate 2008). La identificación de los genes, haplotipos y polimorfismos génicos que afecten los niveles de expresión de proteínas inmunomoduladoras, especialmente citocinas y quimiocinas podrían predisponer a los individuos infectados a un fenotipo inflamatorio y como consecuencia influenciar el desarrollo de la cardiomiopatía chagásica crónica (CCC); lo cual podría servir como marcador de pronóstico, control y también de blanco farmacológico (Dutra WO, et al 2009). En este sentido el Grupo de Inmunología y Epidemiología Molecular (GIEM), ha desarrollado una línea de investigación en la búsqueda de estos marcadores genéticos de asociación y ha descrito polimorfismos asociados con riesgo en los genes *CCR5* (Flórez O, et al 2012), *IL1B* (Flórez O, et al, 2006), *IL12* (Zafra G, et al, 2007), *TGFB* (Calzada JE, et al, 2009), *MIF* (Torres OA, et al, 2009) e *IFNG* (Torres OA, et al, 2010). Otros

grupos han reportado asociaciones con los genes *CCR5* (Calzada, *et al*, 2001; Fernández-Mestre, *et al*, 2004), *MCP1*, *BAT1* y *NFKB* (Ramazawmy, *et al*, 2006, 2007, 2008).

1. LA ENFERMEDAD DE CHAGAS

La EC o también llamada tripanosomiasis americana, es una enfermedad potencialmente mortal causada por la infección con el parásito protozoario *T. cruzi*. Fue descrita por el médico Brasileño, Carlos Chagas en 1909. Inicialmente la enfermedad no era considerada un problema de salud pública de importancia, ya que afectaba prevalentemente a los pobres, no se le daba trascendencia y la medicina la negaba como patología. La EC en su dimensión de pobreza se presenta en regiones donde coexiste con otras enfermedades que son más aparentes y menos silenciosas, razón por la cual frecuentemente pasa desapercibida como un problema de salud (WHO, 2007).

La EC es una compleja zoonosis que se transmite principalmente por las heces de insectos vectores que pertenecen a la familia *Reduviidae* y subfamilia *Triatominae* conocidos como “pitos, vinchucas, chinches” o con otros nombres, según la zona geográfica (WHO, 2010). Fuera de los focos naturales de transmisión vectorial, se ha notificado la transmisión por transfusión sanguínea, donación de órganos, transmisión vertical (de la madre infectada a su hijo), transmisión oral y accidente de laboratorio (WHO 2007, WHO 2010, Dutra WO, et al, 2009). La EC es endémica en Sur y Centro América, encontrándose distribuida desde el sur de Argentina hasta el sur de los Estados Unidos de América (WHO, 2009). Sin embargo, debido a las migraciones humanas, actualmente se han presentado casos en países de Norte América, Europa, Asia y Oceanía (Schmunis GA, 2007, Franco-Paredes, et al, 2010).

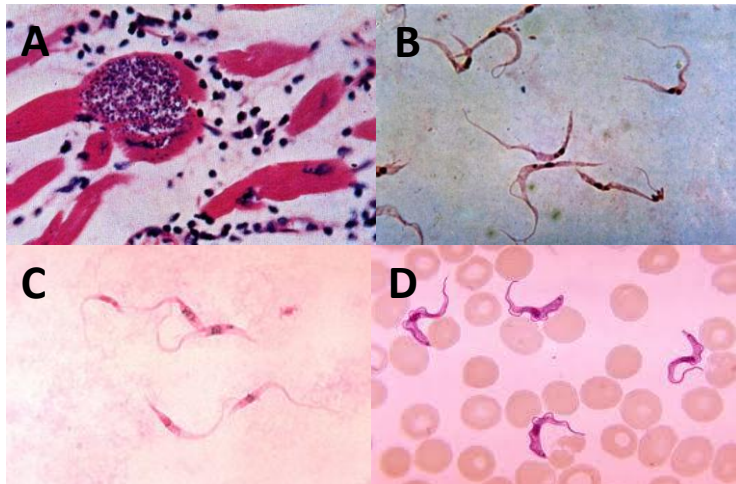
1.1 AGENTE ETIOLÓGICO DE LA ENFERMEDAD DE CHAGAS

El parásito *T. cruzi* es un protozoario flagelado perteneciente a la clase *Mastigophora*, orden *Kinetoplastida*, familia *Trypanosomatidae*, género

Trypanosoma; del grupo *Stercoraria*, que durante su ciclo de vida presenta cuatro formas morfológicas y biológicamente diferentes:

- Amastigote: esférico u ovalado, es la forma reproductiva en el interior de las células mamíferas y se replica por fisión binaria.
- Epimastigote: alargado y flagelado, con el cinetoplasto localizado anterior al núcleo, es la forma reproductiva en el tracto digestivo de los invertebrados y en medios de cultivo.
- Tripomastigote metacíclico: alargado y flagelado, con el cinetoplasto localizado posterior al núcleo. Se encuentra en el intestino y recto del insecto vector y es la forma infectante.
- Tripomastigote sanguíneo: también alargado y flagelado, con el cinetoplasto localizado posterior al núcleo. Se encuentra en la sangre de los mamíferos.

Figura 1. Estadios de *Trypanosoma cruzi*



Fuente: www.fiocruz.br/chagas_esp/cgi/cgilua.exe/sys/start.htm?sid=13.

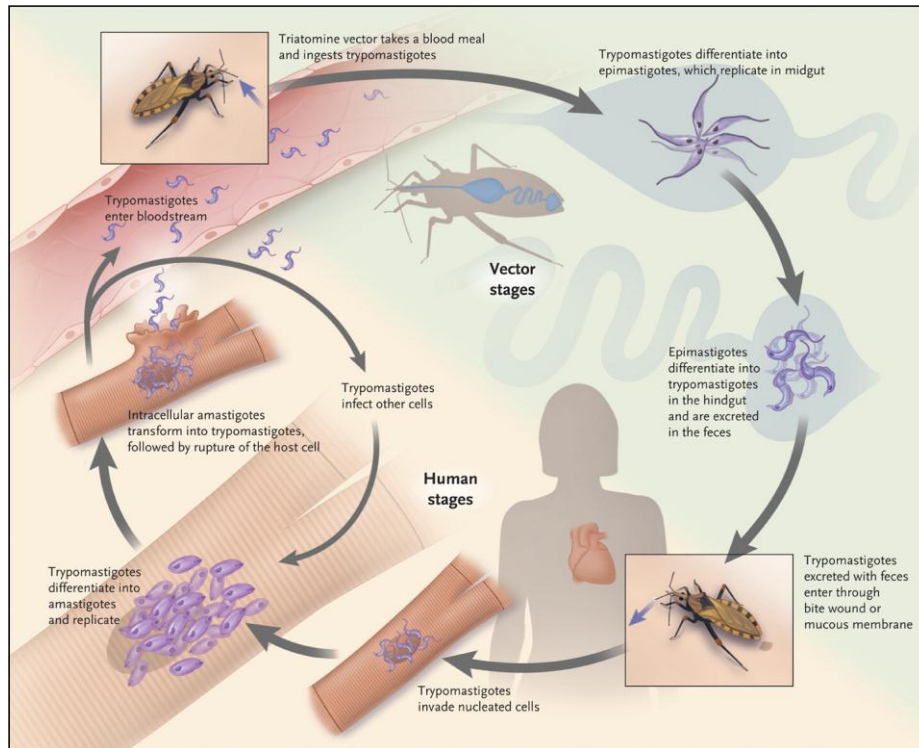
(A) Amastigotes intracelulares. (E) Epimastigotes (C) Tripomastigotes metacíclicos. (D) Tripomastigotes sanguíneos.

1.1.1 Ciclo de vida de *Trypanosoma cruzi*

T. cruzi posee un ciclo de vida complejo que involucra diferentes poblaciones de hospederos vertebrados tales como animales silvestres, animales domésticos y seres humanos y hospederos invertebrados, como los insectos vectores. Durante la alimentación del insecto vector, los tripomastigotes sanguíneos que se encuentran en la sangre del hospedero vertebrado infectado son ingeridos y posteriormente se diferencian a epimastigotes. Cuando la infección se establece en el intestino anterior del insecto vector, los epimastigotes se dividen repetidamente por fisión binaria y pueden adherirse a las membranas perimicrovillares de las células intestinales. Los epimastigotes se conectan a la cutícula rectal y se diferencian a tripomastigotes metacíclicos (un proceso conocido como metaciclogénesis), tanto los epimastigotes como los tripomastigotes pueden ser eliminados a través de las heces y orina del insecto vector, la forma tripomastigote es capaz de infectar al hospedero vertebrado a través de mucosas o heridas en la piel.

Después de ingresar al hospedero vertebrado, los tripomastigotes metacíclicos infectan macrófagos, fibroblastos o células epiteliales presentes en los tejidos, donde se transforman en amastigotes la forma replicativa en el hospedero vertebrado. Después de varios ciclos de división los amastigotes se convierten en tripomastigotes y la célula infectada se rompe liberando los parásitos a la matriz extracelular. De esta forma los tripomastigotes penetran otras células o pasan al torrente sanguíneo llegando a otros tejidos o bien, los tripomastigotes pueden ser ingeridos por el insecto vector durante la picadura al hospedero infectado, completándose el ciclo de vida del parásito (Figura 2).

Figura 2. Ciclo de vida de *Trypanosoma cruzi*



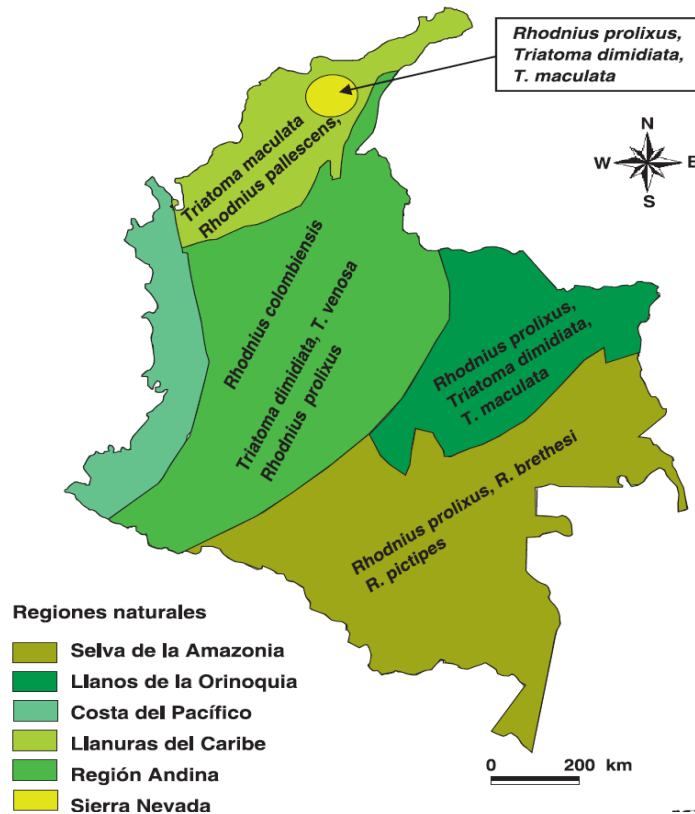
Fuente: Bern *et al.*, 2011

1.2 EL VECTOR PARA LA ENFERMEDAD DE CHAGAS

Los vectores del parásito implicados en la EC son insectos del orden Hemíptera, familia Reduviidae, pertenecientes a la subfamilia Triatominae. Alrededor de 130 especies tanto domiciliarias como silvestres han sido encontradas como potenciales vectores del parásito. En América Latina siete de estas especies tiene particular importancia epidemiológica debido a que pueden ser capaces de colonizar las viviendas, como son *Rhodnius prolixus*, *Rhodnius pallescens*, *Triatoma dimidiata*, *Triatoma infestans*, *Triatoma brasiliensis*, *Triatoma sordida* and *Panstrongylus megistus* (Guhl F, *et al*, 2007. Guhl F, *et al* 2009). Cuatro de estas especies presentan alto grado de adaptación a la vivienda humana incluyendo el peridomicilio, como son *R. prolixus*, *T. infestans*, *T. dimidiata* y *T. brasiliensis* (Guhl F, *et al*, 2009). En Colombia, los vectores más

frecuentes son *R. prolixus*, *T. dimidiata* y *P. geniculatus* (Guhl F, et al, 1999. Sandoval C, et al, 2000. Guhl F, et al, 2007) (Figura 3).

Figura 3. Distribución geográfica de triatominos en Colombia



Fuente: Guhl F, et al, 2007

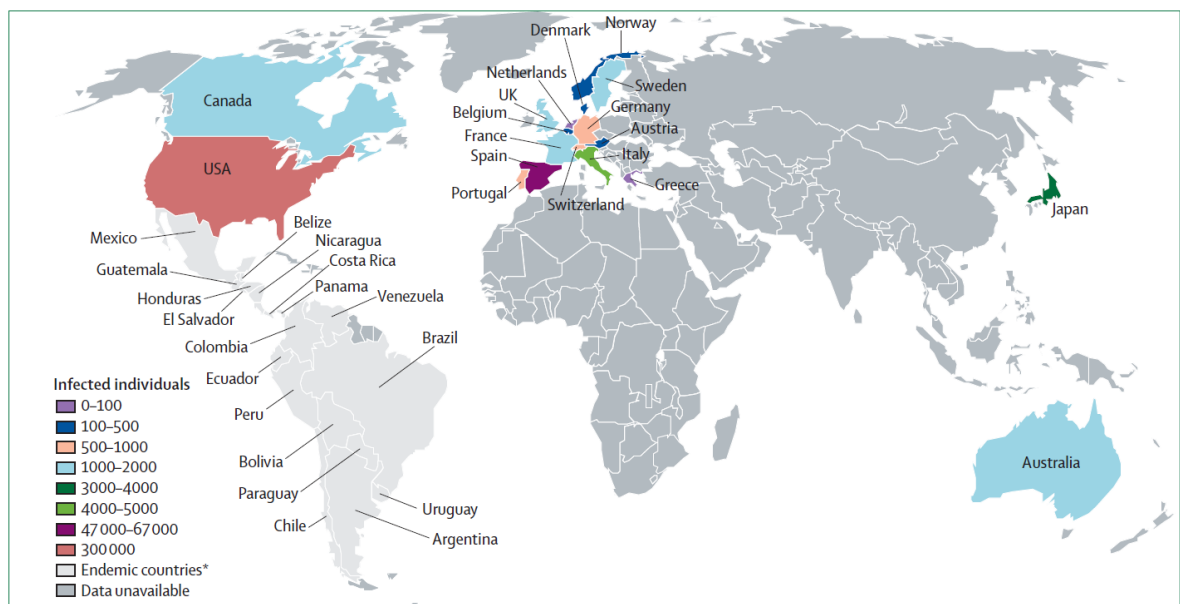
1.3 EPIDEMIOLOGIA DE LA ENFERMEDAD DE CHAGAS

En los últimos años la incidencia de la infección por *T. cruzi* ha tenido una notoria disminución cercana al 70%, gracias a los programas coordinados de erradicación de los vectores adelantados en países del cono sur, como Uruguay, Chile, Argentina y Brasil (Guhl F, et al, 2009). A pesar de los logros obtenidos en estos países, en Colombia y otros países de Centro y Suramérica, la EC aún continúa siendo un problema de salud pública. Se estima que aproximadamente entre 15 a 16 millones de personas están infectadas con *T. cruzi*, y más de 25 millones están

en riesgo de ser infectadas; cerca de un 15 - 30% de las personas infectadas evolucionan hacia cardiomiopatía chagásica y aproximadamente un 10% de los cardiópatas evolucionan a la forma dilatada (Dutra WO, et al, 2009).

La enfermedad se encuentra distribuida en México, Nicaragua, Honduras, Guatemala, El Salvador, Costa Rica, Panamá, Colombia, República Bolivariana de Venezuela, Guyana francesa, Surinam, Belice, Brasil, Ecuador, Perú, Bolivia, Uruguay, Paraguay, Argentina y Chile. En las últimas décadas por los movimientos migratorios la EC se ha detectado con mayor frecuencia en Estados Unidos, Canadá, muchos países Europeos y algunos del Pacífico Occidental, representando un riesgo adicional para la transmisión de la enfermedad a través de la transfusión sanguínea y el trasplante de órganos (26) (Figura 4).

Figura 4. Número estimado de emigrantes con *T. cruzi* viviendo en países no endémicos

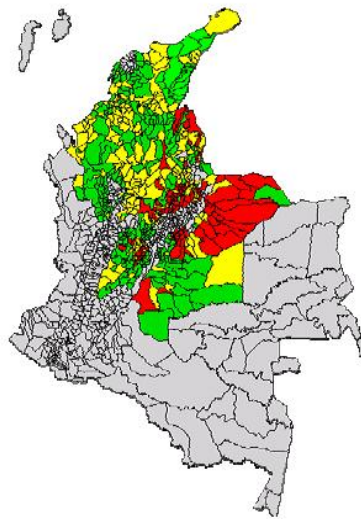


Fuente: Rassi Jr, et al. 2010

La CCC presenta una alta mortalidad, calculada en cerca de 50.000 personas por año (OMS, 2009) y su atención medica incrementa los costos en el sistema de

salud (Castillo-Riquelme M, *et al*, 2008). En Colombia se cree que el 5% de la población se encuentra infectada y el 20% en riesgo de adquirirla. 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%) (Moncayo, *et al*, 2003), lo cual indica que la EC representa un importante problema de salud pública (Figura 5).

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

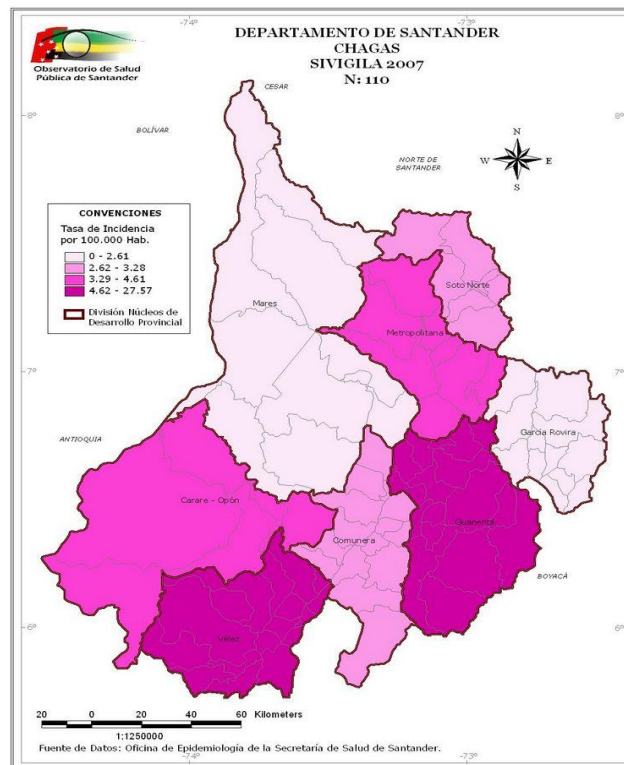


Fuente: Guhl *et al.*, 2005.

A nivel nacional se han reportado altas cifras de seroprevalencia en bancos de sangre, en Santander se tienen cifras reportadas del 1,0% (Sigivila, 2001). Según datos de la Oficina de Epidemiología de la Secretaría de Salud de Santander las provincias Guanentina y Comunera, donde se ubican municipios como San Gil y Mogotes, presenta el mayor número de casos en el departamento con una tasa de incidencia de 28,33 – 300,08 por cada 100.000 habitantes, además municipios como Bucaramanga, Floridablanca, Piedecuesta y Girón reportan una incidencia de 0 – 5,69 por cada 100.000 habitantes; este panorama evidencia que tanto en áreas rurales como urbanas del departamento la EC continúa siendo un problema

de salud pública y social (Sigivila 2007, Gutierrez R, et al, 2004) (Figura 6). Sin embargo, con la implementación de programas de mejoramiento de viviendas a través de la asignación de fondos a los municipios de alto riesgo epidemiológico, se han beneficiado más de 1500 viviendas, controlando al menos en parte, la transmisión vectorial.

Figura 6. Mapa de Santander. Incidencia de Chagas por provincias. Año 2006



Fuente: SIVIGILA, 2007.

Regiones del continente como Brasil, Chile y Uruguay, han sido declaradas como países libres de transmisión gracias a la implementación de acciones que han interrumpido la transmisión vectorial, el tamizaje sistemático de la sangre de donadores, la detección y tratamiento de la transmisión congénita y la administración de tratamiento a los casos agudos y a los niños.

1.3.1 Mecanismos de transmisión

1.3.1.1 Transmisión vectorial: En muchos países de América Latina continúa siendo el principal mecanismo de transmisión y es responsable de más del 70% de los casos. Este se presenta debido a la domiciliación de los vectores, provocada por la desagregación ambiental.

1.3.1.2 Transmisión transfusional: Se ha convertido en la segunda vía más importante de propagación y la principal forma de transmisión en países no endémicos (Canadá, USA, España) y en países latinoamericanos donde ha sido erradicado en vector. Se da por la utilización de unidades de sangre contaminadas.

1.3.1.3 Transmisión congénita: La transmisión al feto en formación se puede producir en cualquier etapa de la infección materna, en embarazos sucesivos, gemelares, en cualquier momento de la gestación o por el canal vaginal durante el parto (Carlier Y, et al, 2005).

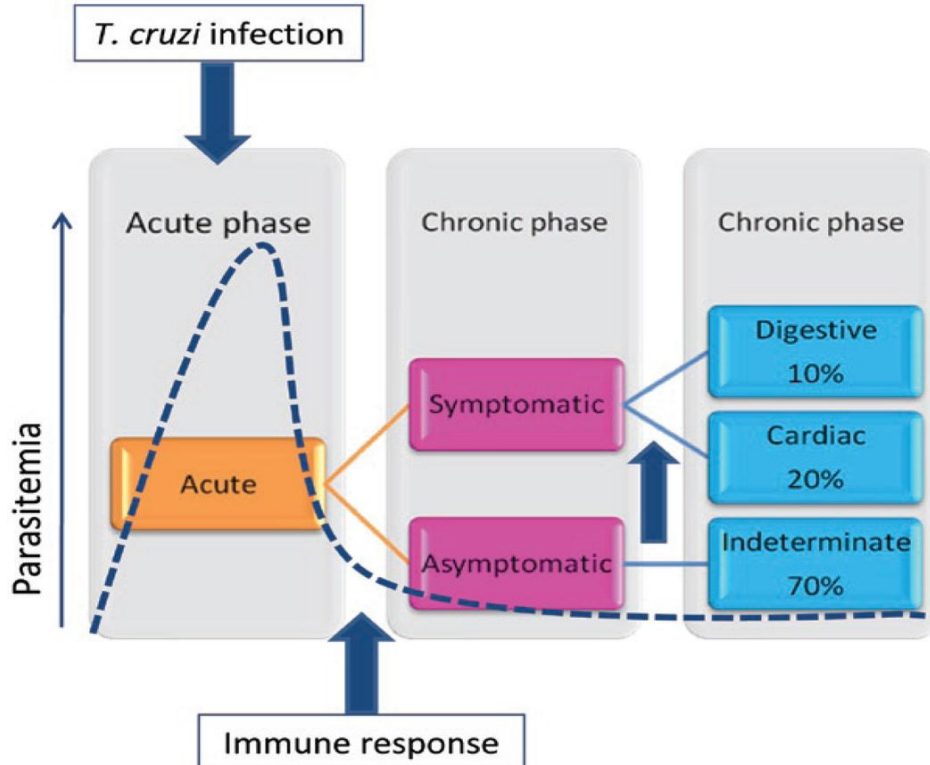
1.3.1.4 Transmisión oral: Ocurre de forma esporádica y circunstancial en humanos por la ingesta de alimentos contaminados con heces y orinas de triatominos u ocasionalmente por secreciones de las glándulas de olor de los marsupiales o sangre de animales salvajes. Generalmente coinciden con épocas de calor y de mayor actividad de los triatominos (Coura JR, et al, 2007).

1.3.1.5 Transmisión accidental: Se puede deber al contacto de mucosas o micro lesiones de piel con cultivos de *T. cruzi*, heces infectadas de triatominos, sangre de pacientes o animales que contienen la forma tripomastigote. Se produce generalmente en laboratorios clínicos, laboratorios de investigación u hospitales en los cuales se realiza una inadecuada manipulación de material infectado, por personal no capacitado o por no manejar las normas de bioseguridad.

1.4. ASPECTOS CLINICOS DE LA ENFERMEDAD

La enfermedad empieza con una fase aguda, la cual puede ser asintomática o sintomática con un síndrome infeccioso severo. Alrededor del 5% de los pacientes muere en este estado. Por otra parte, la mayoría de los individuos infectados permanecen libres de síntomas clínicos (fase indeterminada) con pruebas serológicas positivas. Sin embargo, varios años después, aproximadamente el 30% de los individuos infectados, desarrollan las formas crónicas de la enfermedad, afectando órganos internos, principalmente el corazón (CCC, 27-30% de los casos), colon y esófago (megacolon y megaesófago, 2-5% de los casos) y el sistema nervioso periférico (1-3% de los casos), los cuales los pueden llevar a la muerte (5, 6) (Figura 7).

Figura 7. Evolución clínica de la enfermedad de Chagas (EC).

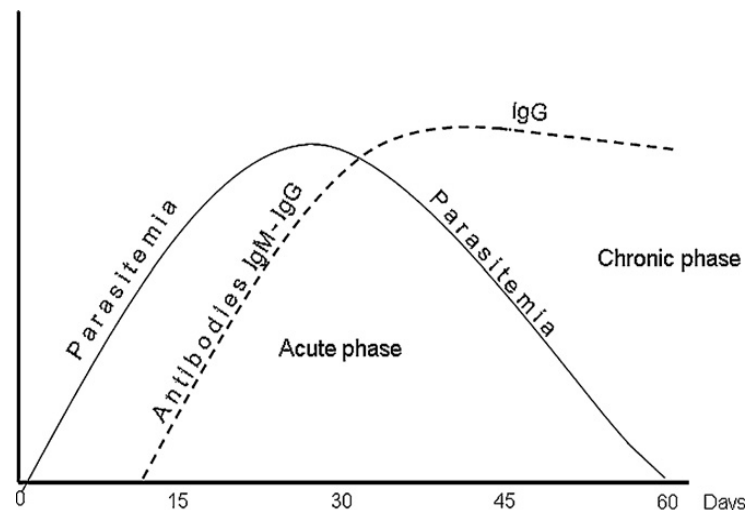


Fuente: Dutra *et al.*, 2009.

1.4.1. Fase Aguda

Se presenta inmediatamente después de la infección con *T. cruzi*, con un tiempo de duración que oscila entre 2 y 4 meses. Esta fase suele ser asintomática y cursa con altos niveles de parasitismo en sangre y tejidos (Sosa-Estani, *et al*, 2006. Coura, *et al*, 2010. Bern C, *et al*, 2011) (Figura 8). La sospecha clínica del médico durante la fase aguda de la infección se ha convertido en un gran desafío, debido a que los individuos a menudo no muestran síntomas y si éstos son evidentes, usualmente son inespecíficos. El 95% de los casos presentan fiebre, cefalea, astenia, mialgia, artralgia, anorexia, hepatoesplenomegalia leve, linfadenopatía y miocarditis.

Figura 8. Dinámica de la parasitemia y respuesta inmune humoral en la fase aguda y crónica de la enfermedad de Chagas.



Tomado: Coura, *et al*, 2010.

Cuando el sitio de inoculación es la mucosa conjuntival, el paciente puede desarrollar edema periorbital unilateral (signo de Romaña), conjuntivitis y

linfadenitis preauricular con la aparición en el sitio de inoculación de un nódulo cutáneo local (Chagoma), el cual se presenta en más del 50% de los casos.

La mayoría de los casos agudos se resuelven y sólo hasta el 5% presentan complicaciones fatales debido a miocarditis y/o meningoencefalitis, generalmente son niños o personas inmunosuprimidas (Coura JR, *et al*, 2007). De los casos agudos detectados y tratados el 75% pueden ser curados; en el evento que la enfermedad no sea curada o detectada tempranamente, los pacientes pueden progresar a la fase crónica de la enfermedad (Dutra WO, *et al*, 2008).

1.4.2. Fase Crónica

Caracterizada por una marcada disminución en la parasitemia como resultado de la respuesta inmune del hospedero, la mayoría de los pacientes en fase crónica son asintomáticos y se clasifican como indeterminados (Rassi Jr, *et al*, 2010). Este periodo inicia entre 8 y 10 semanas después de la infección y puede persistir durante varios años o indefinidamente. En esta fase hay ausencia de síntomas clínicos y el electrocardiograma es normal, no obstante las pruebas serológicas continúan siendo positivas y la parasitemia, aunque no es detectable por métodos directos, puede ser detectada por xenodiagnóstico entre un 20 a 60% de los casos (Guhl F, *et al*, 1999. Mosca W, *et al*, 2007).

Aunque la mayoría de los pacientes crónicos son asintomáticos, aproximadamente el 30% desarrolla patologías asociadas a tejido cardiaco y/o digestivo y en casos severos conduce a la muerte (Ferreira RC, *et al*, 2003. Yacoub S, *et al* 2011. Hernandez-Leiva E, 2011). Personas con infección crónica de *T. cruzi* son potencialmente transmisores del parásito a vectores y a humanos por componentes sanguíneos, donación de órganos y transmisión congénita (Bern C, *et al*, 2011).

La CCC es considerada la forma clínica más importante de la EC. Las manifestaciones clínicas dependen del grado de daño miocárdico, de la presencia de arritmias y del tipo de insuficiencia cardíaca (Rocha MO, *et al*, 2007). Los síntomas más frecuentes son palpitaciones, mareos, disnea de esfuerzo y fatigabilidad. En las formas digestivas crónicas de la EC las manifestaciones clínicas son causadas por la destrucción del plexo mientérico, lo que genera alteraciones en los patrones de secreción, motilidad y absorción de nutrientes; que conducen a megaesófago y/o megacolon (Coura JR, *et al*, 2007).

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

2.1 ASPECTOS INMUNOLÓGICOS

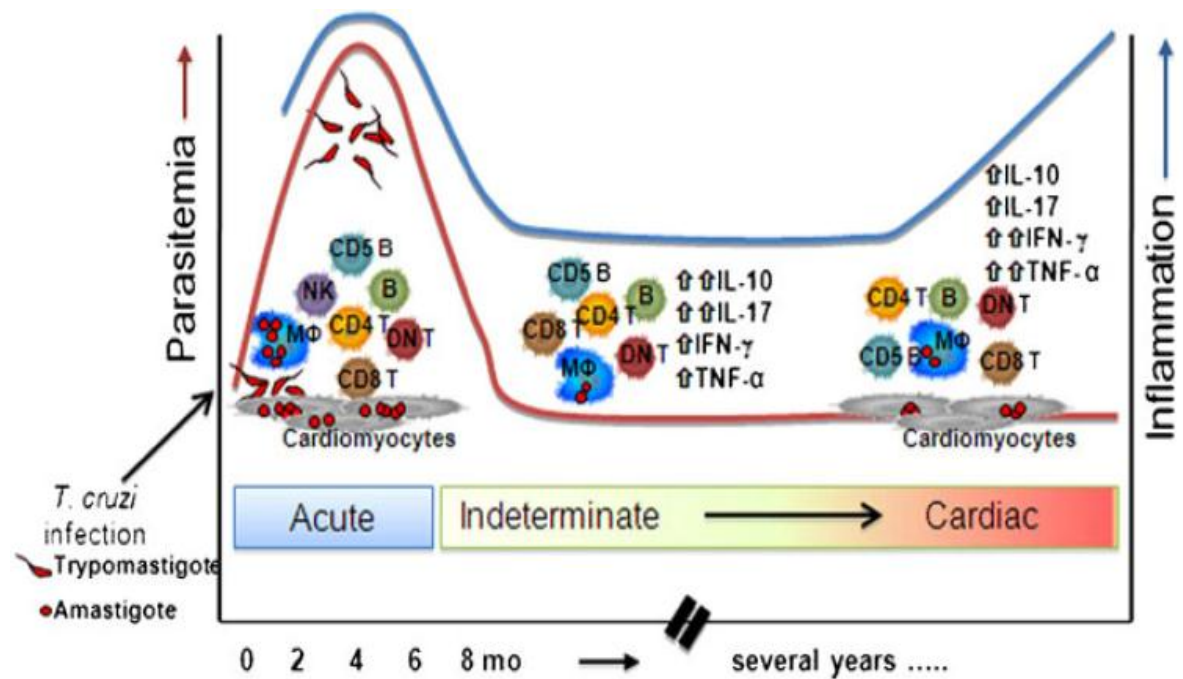
Frente a una sustancia o un organismo extraño, se requiere una respuesta mediada por la acción coordinada tanto de los mecanismos de la respuesta inmune innata como de la respuesta inmune adquirida (Strieter, *et al*, 2002. Kayama H, *et al*, 2010). Ante un peligro el sistema inmune innato inicia una respuesta que origina la liberación de mediadores como prostaglandinas, quimiocinas, citocinas entre otros y la migración de células polimorfonucleares y mononucleares que originan una respuesta inflamatoria localizada. Si esta respuesta del sistema inmune innato es suficiente para eliminar el patógeno, la inflamación se resuelve y el tejido afectado regresa a su condición original, pero si el patógeno no es eliminado se activan elementos de la respuesta inmune adaptativa que generan una respuesta efectora y memoria inmunológica. Paralelamente se desarrolla una respuesta inmune reguladora para limitar el daño y recuperar el tejido, la cual debe estar en equilibrio con la respuesta efectora, si la respuesta reguladora es excesiva no se elimina el patógeno y si por el contrario es disminuida se presenta daño tisular.

Recientemente, se ha demostrado que en el hospedero infectado con *T. cruzi*, la inmunidad innata es de gran relevancia, porque no solamente actúa como primera línea de defensa contra el patógeno, sino que actúa como inmunomoduladora de la respuesta inmune específica, a través de la activación de distintas poblaciones celulares que llevan a su vez a la producción y secreción de grupos específicos de quimiocinas, citocinas proinflamatorias, antiinflamatorias y receptores de estas.

Una respuesta inmunológica eficiente y regulada, elimina o por lo menos controla el organismo extraño y limita el daño tisular, mientras que una respuesta inmune no eficiente induce un proceso inflamatorio crónico con el consecuente daño

tisular, fibrosis y disfunción cardíaca (Bilate AM, et al, 2003. Hernandez E, 2010). (Figura 9).

Figura 9. Citocinas y poblaciones celulares involucradas en la EC.



Fuente: Machado, et al., 2012.

2.1.1 Inmunidad innata

Una vez el parásito pasa de la epidermis, penetra a las células o es fagocitado por macrófagos tisulares. En el interior de ellos se transforma a amastigote y luego a tripomastigote que lisa la célula liberándose al espacio intersticial y diseminándose por todo el organismo, originando un cuadro clínico que varía desde inaparente (el paciente no tiene sintomatología evidente) u oligosintomático, a un cuadro agudo con sintomatología importante, parasitemia evidente y respuesta inflamatoria (Rassi Jr, et al, 2010).

El parásito activa elementos de la respuesta innata, a través de patrones moleculares asociados a patógenos (PAMPs), entre ellos están el glicofosfatidilinositol o GPI anclado, glicoproteínas unidas al GPI como la mucina y la transialidasa, proteína Tol A del flagelo (Gazzinelli and Denkers, et al, 2006), que estimulan a receptores de reconocimiento de patrones (PRRs). Entre los diversos PRRs, los receptores tipo Toll o TLRs son los más estudiados. La unión de los TLRs con los PAMPs con excepción del TLR3, induce la producción de citocinas de manera dependiente del factor nuclear κB (NF- κB) a través de una vía de señalización que involucra la molécula adaptadora MyD88 en macrófagos, células dendríticas y células natural killer (NK) (Tarleton, et al 2007). La unión de los PAMPs y los PRRs estimulan la producción de mediadores proinflamatorios, incluyendo factor de necrosis tumoral alfa (TNF- α), IL12, los cuales aumentan la producción de interferón gamma (INF- γ) y óxido nítrico (Kayama H, et al, 2010.), que actúan como primera línea de defensa contra *T. cruzi* al aumentar la capacidad de los macrófagos para destruir el parásito, además de modular la respuesta inmune adaptativa.

Un ambiente de citocinas y la activación de las células presentadoras de antígeno estimulan a los linfocitos T y B para conformar la respuesta inmune adaptativa.

2.1.2 Inmunidad adaptativa

La respuesta inmune mediada por células tiene un proceso de maduración. Después de la interacción entre los PAMPs y las células presentadoras de antígenos, los epitopes antigénicos son presentados por el complejo mayor de histocompatibilidad I o II a los linfocitos T. Los linfocitos T que reconocen los epitopes presentados, junto con moléculas coestimuladoras como CD80, CD86 y CD40, son estimulados y en presencia de un ambiente de quimiocinas y citocinas se convierten de linfocitos Th 0 a linfocitos Th1 o Th2 (Souza PE, et al, 2004).

Las distintas subpoblaciones de linfocitos T ayudadores efectores se diferencian por el perfil de citocinas que generan, de tal manera que los Th1 producen INF- γ , TNF- α y β que estimulan la destrucción del patógeno por los macrófagos o la activación de los LT CD8+. Los linfocitos Th2 presentan una respuesta efectora mediada por IL 4, IL 5, IL 6, IL 10, IL 13 y TGF- β , algunas de ellas estimulan la producción de anticuerpos efectores. La IL-10 producida por los linfocitos Th2 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. (Coura JR, et al, 2010. Dutra WO, et al, 2008).

2.1.3 Importancia de la inflamación en la CCC

La CCC se caracteriza por infiltrados linfocitarios, fibrosis y pérdida de contractibilidad del tejido cardíaco. Las reacciones inflamatorias observadas, tanto durante la fase aguda como la fase crónica de la EC, desempeñan un papel importante en su patogenia. Los linfocitos T CD8+ son de gran relevancia en la generación de la miocarditis y cardiopatía crónica, ya que existe predominancia de estas células en el infiltrado inflamatorio del tejido cardíaco de ratones infectados, así como en el corazón de pacientes chagásicos crónicos. Con relación a la acumulación preferencial de esas células en los tejidos blanco, el aumento de la expresión de citocinas como IFN- γ , TNF- α , IL-6 e IL-4, moléculas de HLA de clase I y II, moléculas de adhesión y de las quimiocinas inducidas por IFN- γ y sus receptores (MCP-1, IP-10, MIG y CCR2, CCR5 y CXCR3) parecen estar involucradas en el proceso de migración. Las quimiocinas y sus receptores tienen un papel esencial en el reclutamiento y activación de leucocitos a los sitios afectados, siendo responsables de los procesos inflamatorios. Estudios en CCC han mostrado que cuando el parásito persiste en el tejido se producen quimiocinas

específicas en respuesta a este, por lo cual su presencia puede llevar a un proceso inflamatorio crónico, responsable del infiltrado inflamatorio y de los daños en el tejido miocárdico. De igual manera se ha demostrado prevalencia de linfocitos T CD8+ y en menor proporción linfocitos T CD4+ y macrófagos, formando estos infiltrados inflamatorios en el corazón lo que se asocia con altos niveles de quimiocinas CCL3, CCCL4, CCL5 (RANTES) y su receptor CCR5.

El concepto más aceptado sobre la evolución crónica de la infección por *T. cruzi* dice que, en respuesta a la permanencia de los parásitos en órganos-blanco de la infección, la respuesta inmune específica resulta en un proceso inflamatorio exacerbado con consecuentes efectos perjudiciales en estos tejidos. Entre los componentes exacerbados en este proceso inflamatorio, parece ser clave la presencia de altos niveles de IFN- γ . Este postulado parece paradójico si consideramos que una respuesta antiparasitaria efectiva sería crítica para el control de la infección y, consecuentemente, impediría la posible progresión a formas clínicas graves de la enfermedad. Lo que parece clave en esta discusión es la noción de regulación en el sistema inmune, proceso con múltiples componentes fundamentales para el bloqueo de eventuales daños que seguirían a una respuesta inmune efectora. Recientemente, fue propuesto que el desbalance entre los mecanismos oxidantes/antioxidantes y citoquinas proinflamatorias/antiinflamatorias, 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 (Dutra et al., 2009).

3. ASPECTOS GENÉTICOS Y BIOQUÍMICOS

Los múltiples mediadores moleculares involucrados, la heterogeneidad, el grado de severidad de las manifestaciones clínicas de la EC y el hecho que sólo un 30% de los infectados evolucione a CCC, llevan a plantear que el componente genético está involucrado en su patogénesis. Sin embargo, la susceptibilidad genética a la infección por *T. cruzi* y el desarrollo de la CCC es compleja y poligénica (Dutra WO, et al 2009. Nieto A, et al, 2000). Estudios recientes han evaluado polimorfismos genéticos en genes que codifican moléculas relacionadas con el control de la respuesta inmune y la susceptibilidad genética a la CCC (Calzada JE, et al, 2001. Ramasawmy R, et al, 2008. Torres OA, et al, 2009).

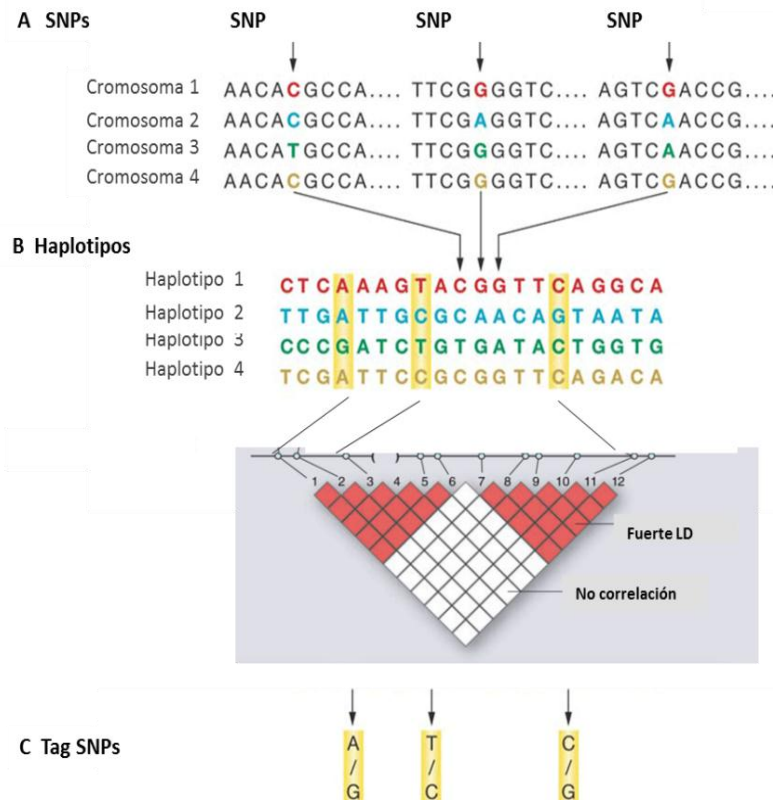
Los polimorfismos genéticos son variantes del genoma que aparecen por mutaciones en algunos individuos, se transmiten a la descendencia y presentan cierta frecuencia en la población tras múltiples generaciones (Iniesta R, et al, 2005). La variabilidad fenotípica de cada individuo está determinada de forma significativa por los polimorfismos de nucleótido simple- SNPs (del inglés: single nucleotide polymorphism), y en menor grado a inserciones, deleciones, secuencias repetidas y/o re-arreglos cromosómicos debido a que el genoma humano no es una estructura estática. Los polimorfismos son la base de la evolución y los que se consolidan, bien pueden ser silentes o proporcionar ventajas a los individuos, aunque también podrían contribuir a causar enfermedades (Benhamou S, et al, 2002).

Los polimorfismos de único nucleótido (SNPs) han sido la principal clase de variantes estudiadas y son la forma más prevalente de variaciones genéticas entre individuos. En base a los resultados de secuenciación, se estima que el genoma humano tiene aproximadamente 37 millones de SNPs y en un genoma individual se pueden tener hasta 3 millones de estas variantes (Ali JM, 2011). Gracias al Proyecto Hapmap conocemos cómo se distribuye el desequilibrio de ligamiento

(DL) a lo largo del genoma humano y cuáles son los SNPs que representan mejor cada bloque haplotípico en las diferentes poblaciones ancestrales como son la caucásica, asiática y africana (Frazer et al., 2009, Cordero P, et al, 2012).

Cuando los marcadores se encuentran en total DL (D' o $r^2=1$) 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 (Figura 10). Dada la alta variabilidad alélica en el genoma humano, la probabilidad de que dos individuos no relacionados presenten un mismo haplotipo, es prácticamente nula. Es por esto que el estudio de haplotipos se ha convertido en una herramienta útil en la determinación de relación genética entre individuos y por lo tanto en el estudio del origen de mutaciones de diversas enfermedades.

Figura 10. Estructura de la variación genética del DNA en el genoma humano



Fuente: Modificado de Altshuler D. *Science* 2009

Dada su alta frecuencia, estabilidad y baja tasa de mutación, los SNPs han sido ampliamente utilizados en estudios de asociación por su posible papel en la patogénesis de diversas enfermedades complejas y poligénicas, es así como han sido evaluados en enfermedades comunes, desde autoinmunes, oncológicas, neurológicas e infecciosas; aumentando enormemente nuestra comprensión del genoma humano y convirtiéndose en la base de la genética humana moderna (Cordero P, *et al*, 2012).

La EC es considerada como una enfermedad compleja y poligénica en donde factores tanto ambientales como genéticos del hospedero y del parásito podrían ejercer un efecto o influenciar el desarrollo de la enfermedad (Palmer LJ, *et al*, 2005). En esta enfermedad se han adelantado estudios de asociación genética, la mayoría de genes estudiados están relacionados con la inmunopatogenicidad de la enfermedad entre ellos aquellos involucrados con funciones de reconocimiento, citocinas, quimiotaxis, factores de crecimiento, ligandos celulares, moléculas de adhesión, señalización intracelular y factores de transcripción (Tabla 1).

El comprender los mecanismos de patogenicidad de la EC permitiría seleccionar SNPs en genes específicos (genes candidato), convirtiéndolos en marcadores de riesgo, pronóstico o en posibles blancos terapéuticos (Huizinga TW, *et al*, 2004. Ali JM, 2011). El análisis e identificación de genes candidatos utilizados en estudios de casos y controles o en estudios prospectivos de asociación (Ali JM, 2011), 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).

Tabla 1. Polimorfismos genéticos estudiados en el hospedero en la enfermedad de Chagas

Gen	Polimorfismo SNPs	Susceptibilidad / Asociación	Referencia
HLA	Clase I y Clase II	Contradictoria	Deghaide, 1998; Fernandez-Mestre 1998; Colorado 2000, Fae 2000; Layrisse, 2000; Nieto, 2000; Cruz-Robles, 2004
Cadena pesada de Miosina Cardíaca β	(CATT) n	Negativa	Fae, 2000
CCL2 / MCP1	-2518	CCC	Ramasawmy, (2006a)
CCR5	+53029	CCC	Calzada, (2001a)
NRAMP1	5'(GT) n , -236C-->T, D543N, 3'UTR delección	Negativa	Calzada, 2001b
NOS2	(CCTTT) n	Negativa	Calzada 2002
TNF- α	-308, -238	Negativa	Beraun, 1998, Drigo et al. 2007
TNF- α	-308	CCC	Rodríguez – Pérez 2005
TNF- α	-308	Progresión a muerte / Transplante de corazón	Drigo, 2006
LTA	+80, +252	CCC	Ramasawmy, 2007
BAT-1	-22, 348	CCC	Ramasawmy, 2006b
NFKB, IL-1	-62, -262	CCC	Ramasawmy, 2008
IL-1B	-31, +3954, +5810	CCC	Flóres, 2006
IL-10	-1082	CCC	Costa, 2009
IL12B	+1188	CCC	Zafra, 2007
TLR2, TLR4	Arg753Gln Asp299Gly Thr399Ile	Negativa	Zafra, 2008
TLR1, TLR2, TLR4, TLR5, TLR9	+1858	Negativa	Ramasawmy, 2009
PTPN22	+1858	Negativa	Robledo, 2007
MIF	-173	CCC	Torres, 2009
TGF β	-988, -800, -509, +263, +10	Negativa CCC	Torres, 2009
IL6	-174	Negativa	Torres, 2009
IFN γ	+874	Negativa	Torres, 2009
MAL / TIRAP	S 180L	CCC	Ramasawmy, 2009
ACE	I / D	Negativa	Cuoco, 2005. Pascuzzo – Lima 2009

CCC. Cardiomiopatía Chagásica crónica

Fuente: Tomado y modificado de Cunha – Neto *et al*, 2009. González CI and Mantilla JC, 2012.

3.1 CCR5

CCR5 es el principal receptor celular para CCL5 (RANTES), MIP-1 α (CCL3) y MIP-1 β (CCL4), quimiocinas que inducen la quimiotaxis de células del sistema inmune (linfocitos, monocitos/macrófagos, células asesinas naturales (NK), células dendríticas) al sitio afectado e incrementan la afinidad de *T. cruzi* por los macrófagos humanos mejorando la producción de óxido nítrico y controlando la replicación del parásito. La Tabla 2 muestra los receptores de quimiocinas y sus ligandos.

Tabla 2. Receptores de quimiocinas CC y sus ligandos

Receptor	Ligando	Ligando con nueva nomenclatura
CCR1	MIP1- α , RANTES, MCP-3, HCC-1, HCC-4, MPIF-1	CCL3, CCL5, CCL7, CCL14, CCL15, CCL16, CCL23
CCR2	MCP-1, MCP-3, MCP-2, MCP-4	CCL2, CCL7, CCL8, CCL13
CCR3	RANTES, MCP-3, MCP-2, Eotaxin, MCP-4, HCC-2, Eotaxin-2, Eotaxin-3	CCL5, CCL7, CCL8, CCL11, CCL13, CCL15, CCL24, CCL26
CCR4	TARC, MDC	CCL17, CCL22
CCR5	MIP-1 α , MIP-1 β , RANTES, MCP-2	CCL3, CCL4, CCL5, CCL8
CCR6	MIP-3 α	CCL20
CCR7	MIP3 β , SLC	CCL19, CCL21
CCR8	I-309	CCL1
CCR9	TECK	CCL25
CCR10	CTACK, CCL28	CCL27, CCL28

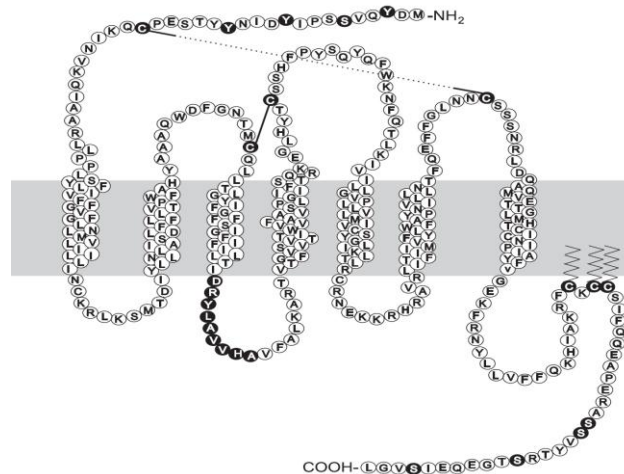
Fuente: Tomado y modificado de (Balistreri CR, et al, 2007)

3.1.1 Estructura proteica de CCR5

El receptor CCR5 es una proteína de 352 aminoácidos (Figura 11), con una masa molecular de 40.600 Da y un sitio potencial de glicosilación ligado al extremo aminoterminal (Choi WT, et al, 2011). El análisis de la secuencia de aminoácidos

de CCR5 reveló 7 tramos de aminoácidos hidrofóbicos, la mayoría correspondiente a 7 hélices transmembrana, un extremo aminoterminal extracelular y un carboxiterminal intracelular. Esta estructura es consistente con ser una proteína G acoplada a receptor (GPCR del inglés *G protein coupled receptor*).

Fig.11. Estructura proteica de CCR5



Fuente: Tomado de (Oppermann 2004).

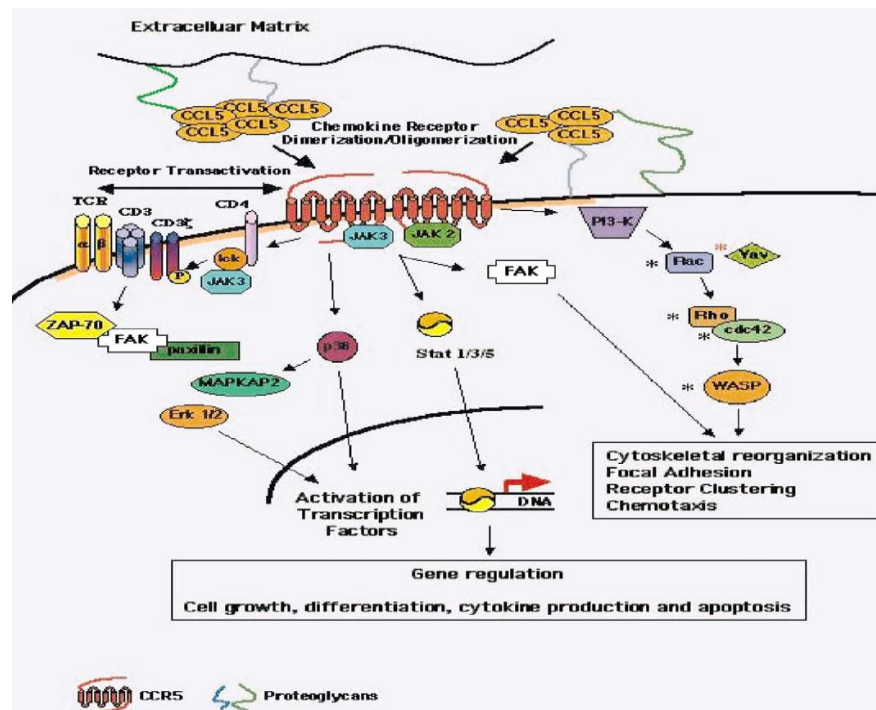
3.1.1.2 Función

CCR5 tiene múltiples funciones en la respuesta inmune, como el reclutamiento de células al sitio de infección y posteriormente en el establecimiento de las bases para una adecuada respuesta inmune y formación de sinapsis inmunológica (Wong MM, 2003). La interacción CCL5-CCR5 determina la diferenciación de las células Th1. Estudios sugieren que IL2 induce la expresión de CCR5 en LT, mediada por una retroalimentación positiva.

El receptor CCR5 media la quimiotaxis después de la interacción con sus ligandos CCL3, CCL4, CCL5 y CCL8 (Onuffer JJ, et al, 2002). CCR5 es expresado por linfocitos, monocitos/macrófagos, células asesinas naturales (NK), células dendríticas derivadas de sangre periférica, células endoteliales, epitelio, músculo liso vascular y fibroblastos. La expresión de CCR5 además ha sido reportada en células progenitoras hematopoyéticas CD34, células de Langerhans, neuronas, astrocitos y timocitos. (Bajetto A, et al, 2002. Muller A, et al, 2004).

En la figura 12 podemos observar las vías de señalización activadas por la unión de la quimiocina con el receptor CCR5. Esta se une a proteoglicanos presentes en la matriz extracelular, formando agregados que posteriormente se unen al receptor CCR5 produciendo dimerización – oligomerización del mismo. La unión al receptor se localiza en las balsas lipídicas (líneas naranjas) e induce la señalización a través de la activación de la célula T, lo cual afecta su función.

Figura 12. Vías de señalización en el receptor CCR5



Fuente: Tomado de (Wong MM, 2003)

La transducción de señal a través de CCR5 juega un papel importante tanto en procesos fisiológicos como patológicos, incluyendo inflamación y hematopoyesis. En diferentes enfermedades autoinmunes, la alta expresión de ligandos de este receptor permite la migración o quimiotaxis de linfocitos Th1 hacia los tejidos comprometidos, promoviendo la inflamación y el daño tisular (Turner, *et al*, 2007).

3.1.2.1 CCR5 en enfermedad de Chagas

En EC existe evidencia experimental relacionada con el papel de CCR5 en la fase inicial de la infección para controlar el parásito. En ratones, la infección con *T. cruzi* estuvo acompañada de un aumento en la expresión de CCR5 y los ratones CCR5^{-/-} tuvieron niveles altos de parasitemia y una mortalidad mayor, en comparación con los ratones de tipo salvaje.

Aunque las células cardíacas contribuyen al control del crecimiento del parásito, también están implicadas en la persistencia del daño cardíaco. Existe evidencia experimental que sugiere que los receptores de quimiocinas pueden contribuir al daño del tejido cardíaco durante la enfermedad de Chagas (Cunha-Neto, *et al*, 2009. Medeiros GA, *et al*, 2009. Marino AP, *et al*, 2005. Talvani A, *et al*, 2004. Coelho PS, *et al*, 2002. Manque PA, *et al*, 2011). En la infección experimental con *T. cruzi*, la prevalencia de linfocitos T CD8⁺ en tejido cardíaco ha sido relacionada con la producción temprana de quimiocinas CC: CCL3, CCL4 y CCL5, así como la regulación positiva de CCR5 sobre leucocitos circulantes. El papel relevante de las interacciones mediadas por CCR5 en la miocarditis desencadenada por *T. cruzi*, se ha evaluado en el tratamiento con Met-RANTES, un antagonista parcial de CCR1/CCR5, el cual disminuye el infiltrado celular en corazones murinos infectados con *T. cruzi* (Marino *et al* 2004, Medeiros *et al* 2008).

En la CCC los linfocitos que infiltran el miocardio expresan de manera especial receptores de quimioquinas, entre ellos el CCR5, los cuales se expresan con

mayor frecuencia en pacientes con alteraciones cardíacas comparados con pacientes asintomáticos (Fernandez-Mestre, et al, 2004). La frecuencia y densidad de CCR5 es regulada positivamente en esplenocitos y leucocitos de sangre periférica de animales infectados con *T. cruzi* a las 7 días post-infección (Silva et al 2007). Sin embargo, a los 28 días post-infección la expresión de CCR5 se encontró principalmente en linfocitos T CD8+, sugiriendo que CCR5 y sus ligandos pueden ser importantes en la entrada preferencial de linfocitos T CD8+ en el tejido cardíaco.

Dada su relevancia en la patogénesis se ha planteado que este receptor podría ser utilizado como un posible marcador de riesgo, pronóstico o blanco terapéutico (Talvani, et al, 2004. Kroll-Palhares K, et al, 2008).

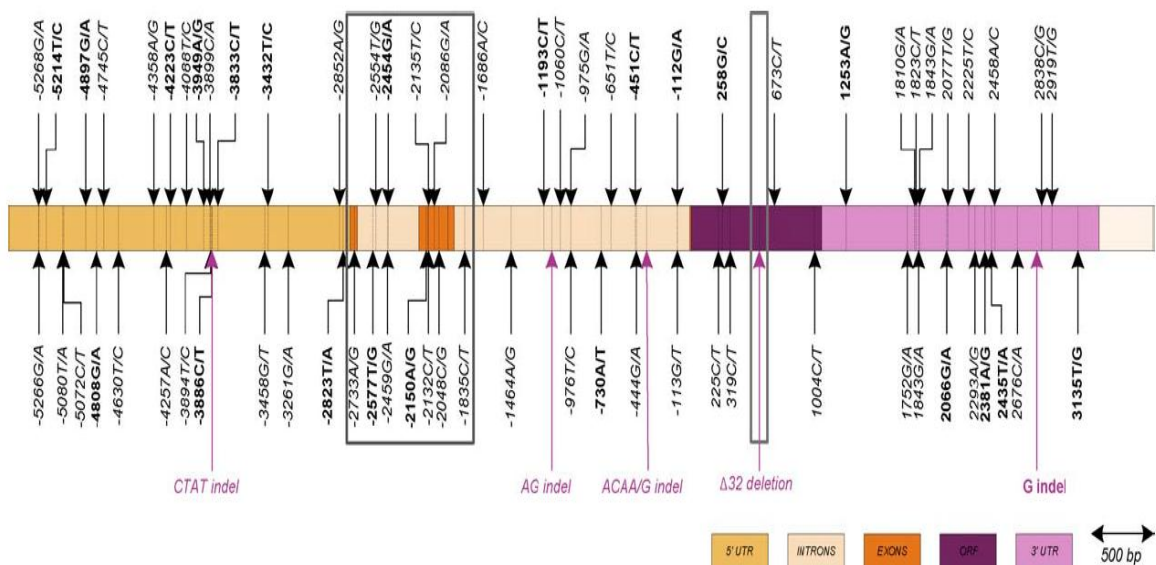
3.1.3 Estructura del gen *CCR5*

Los genes de quimiocinas y receptores de quimiocinas están agrupados en el genoma humano. La mayoría de genes de receptores de quimiocina-CC se han evidenciado mapeando dentro de la región 3p21.3 (Samson et al., 1996). La agrupación de genes de quimiocinas y receptores de quimiocinas sugiere una rápida evolución de ambas familias de genes por duplicaciones locales.

El gen *CCR5* se encuentra en el cromosoma 3, en la posición 3p21.3, se extiende aproximadamente 6 kb (500pb) y está conformado por 4 exones y 2 intrones. La transcripción inicia en dos promotores distintos y patrones complejos de "splicing alternativo" en el extremo 5' corriente arriba y en los 4 exones que dan lugar a múltiples ARN mensajeros maduros (Picton ACP, et al, 2010). Las regiones reguladoras y las de los intrones son polimórficas y basándose en el DL estos polimorfismos están organizados en 7 haplogrupos (clusters) evolutivamente diferentes. Estos haplotipos presentan diferencias en la regulación transcripcional

y en la unión a factores de transcripción, estudiados a profundidad en VIH (Mummidi et al 2000). Está establecido el cluster principal que incluye CCR1, 2, 3, 5 y 8, así como CCXCR1 dentro de la región 3p21.3, y la localización más distal de CCR4 en la región p24 región, con un tamaño aproximado de 425 kb. (Samson et al., 1996, Maho et al., 1999).

Fig.13. Estructura y polimorfismos del gen CCR5



Fuente: Tomado de (Picton ACP, 2010)

3.1.3.1 Polimorfismos del gen CCR5

La expresión de CCR5 puede ser regulada por un amplio espectro de polimorfismos localizado corriente arriba y abajo del promotor, el cual incluye la región intrónica entre los exones 1 y 3 (Figura 13). El análisis de secuencia de la región *cis*- regulatoria del CCR5 (-2671 a -1835) reveló 32 sitios variables que definen 27 haplotipos humanos. Basado en 7 polimorfismos (-2733 A/G,-2554

G/T, -2459 G/A, -2135 T/C, -2132 C/T, -2086 A/G y -1835 C/T), 7 grupos distintos de esos haplotipos fueron designados como haplogrupos humanos de CCR5 (HH)-A, -B, -C, -D, -E, -F, y -G. Los haplogrupos de CCR5 además involucran el haplotipo P1 (208*G, 612*A, 626*C, 627*C, 630*C, 647*C, 676*A, 684*T, 714*C, 811*G), que está en desequilibrio de ligamiento con CCR5 Δ 32 y CCR2-64I (Martin MP, et al, 1998).

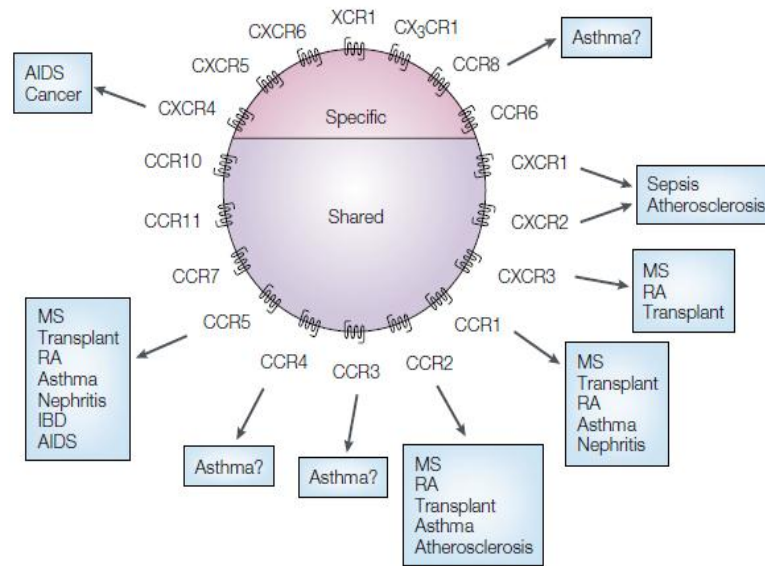
En el gen CCR5, la delección de 32 pares de bases CCR5 Δ 32 en ORF (del inglés *open reading frame*), resulta en una proteína truncada por lo que no es exportado a la superficie celular. Este polimorfismo es el más estudiado y está presente en varias poblaciones Caucásicas en una frecuencia alrededor del 9%, mientras está casi ausente en algunos grupos étnicos como Amerindios, Africanos, Japoneses y Chinos (Samson et al 1996, Wang et al 2003). El estado homocigoto de CCR5 Δ 32 protege contra la infección por el VIH, mientras que el heterocigoto disminuye la velocidad de progresión al síndrome de inmunodeficiencia adquirida (SIDA). Recientes estudios proveen evidencia del efecto protector de la variante CCR5 Δ 32 en artritis reumatoidea en una cohorte de Nueva Zelanda. Un estudio encontró una relación entre CCR5 Δ 32 y el alelo G del SNP rs1799987 con el desarrollo de nefropatía diabética, pero solo en hombres (Mlynarski WN, et al, 2005).

Otro polimorfismo presente en el promotor que ha sido bastante estudiado es el 59029 A/G, descrito también como -2459 (rs1799987), debido a que afecta el nivel de expresión del receptor disminuyendo la velocidad de desarrollo del SIDA (Bilate MB, et al, 2008. Mummidi S, et al, 2000). Estudios han reportado que el alelo G de este SNP tiene una actividad más baja del promotor *in vitro*, que el alelo A y el genotipo A/A resulta en una expresión más alta en células T CD4+. (McDermott et al., 1998, Shieh et al., 2000).

Investigaciones realizadas en Venezuela y en Perú, evidenciaron que el genotipo heterocigoto para la mutación 59029A/G y el alelo G es significativamente más frecuente en pacientes asintomáticos infectados por *T. cruzi* que en pacientes con CCC, al parecer protegiendo a los pacientes de desarrollar compromiso clínico cardíaco. De esta manera se postula que al progresar la enfermedad, la expresión del CCR5 podría disminuir, por la presencia del alelo G, alterando el proceso de reclutamiento y quimiotaxis de linfocitos Th1, atenuando la respuesta inmune crónica en contra del parásito y el grado de daño tisular (Fernandez-Mestre, *et al*, 2004).

Recientemente, un estudio realizado en el grupo de Inmunología y Epidemiología molecular, en 260 individuos seropositivos para *T. cruzi*, encontró diferencias estadísticamente significativas en la distribución del haplogrupo humano (HH)-A. Además se evidenció que el alelo G del SNP *CCR5* -2733 y el alelo T del SNP *CCR5* -2554, estuvieron asociados con un riesgo reducido a la susceptibilidad y severidad al desarrollo de CCC, respectivamente (Flórez O, *et al*, 2012). Sustituciones en las regiones regulatorias de *CCR5* producen diferencias en la actividad transcripcional. En este sentido, el alelo G del SNP -2733 se une al factor de transcripción nuclear (NF1) en tres líneas celulares humanas y el alelo T del SNP -2554 se une con mayor avidez que el alelo G a miembros de la familia de factores de transcripción NF-kB (Mummidi *et al* 2000).

Figura 14. Receptores de quimiocinas y enfermedad



Fuente: Tomado de (Proudfoot et al 2002)

3.1.3.2 Enfermedades asociadas con polimorfismos en CCR5

Se ha demostrado que CCR5 está involucrado en la patogénesis de diferentes enfermedades inflamatorias. Varios estudios han sido llevados a cabo para investigar la relación entre polimorfismos de *CCR5* y la susceptibilidad/resistencia a algunos desórdenes inmunológicos, tales como esclerosis múltiple (Jakkula E, et al, 2010), lupus eritematoso sistémico (Hughes T, et al, 2011), artritis reumatoidea (Stahl EA, et al, 2010) y otras enfermedades inflamatorias como diabetes mellitus tipo 1 (Barrett JC, et al, 2009), aterosclerosis, enfermedad de Kawasaki (Jhang WK, et al, 2009), soriasis (Soto-Sánchez, et al, 2010) y alzheimer y enfermedades infecciosas con el virus de hepatitis C, Citomegalovirus (Loeffler J, et al, 2006) y VIH (Pokomy V, et al, 2005).

La delección *CCR5*Δ32 presente en el gen *CCR5*, ha sido bastante estudiado sobretodo en población caucásica. Esta delección da como resultado una pérdida de funcionalidad del receptor *CCR5*. En aterosclerosis, *CCR5*Δ32 incrementa el riesgo de aneurisma aórtico abdominal (Ghilardi G, 2004). En infarto del miocardio se ha reportado que quienes presentan la delección *CCR5*Δ32 están protegidos contra episodios tempranos (González P, 2001). En pacientes con esclerosis múltiple las células T que expresan el receptor *CCR5* están incrementadas en sangre. La delección *CCR5*Δ32 se asocia con un menor riesgo de recurrencia de la enfermedad clínica (Sellebjerg F, 2000). En artritis reumatoide, la presencia de la delección *CCR5*Δ32 está asociada con un efecto protector de artritis reumatoide según un estudio realizado en Nueva Zelanda (Pokorny V, 2005). Se ha encontrado que *CCR5*Δ32 predispone a la aparición de diabetes mellitus tipo 1 (Kaeu I, 2003). Un estudio posterior encontró una asociación de *CCR5*Δ32 y *CCR5*-2459 * alelo G con el desarrollo de nefropatía diabética, pero sólo en los hombres, mientras que el haplotipo que contiene el alelo A del SNP *CCR5*- 2459 * y la ausencia del *CCR5*Δ32 tienen efectos protectores (Mlynarski WM, 2005).

En la infección con VIH, junto con el receptor CD4, el *CCR5* es utilizado como un co-receptor del virus para infectar macrófagos. De acuerdo con las hipótesis actuales, los homocigotos para la delección *CCR5*Δ32 presentan una resistencia total a la infección por VIH, mientras que los heterocigotos en *CCR5*Δ32 presentan un retraso en la aparición del síndrome de inmunodeficiencia adquirida (SIDA) (O'Brien SJ, 2000).

La Enfermedad de Kawasaki es un síndrome vascular agudo de etiología desconocida que afecta a pequeñas y medianas arterias. En un estudio sobre población infantil Coreana se informó que el alelo T del polimorfismo *CCR5* (-2135 C/T) puede estar asociado con el desarrollo de esta enfermedad (Jhang WK, et al, 2009). En un estudio realizado sobre población norteamericana (USA), fue reportado que polimorfismos de *CCR5* (-2554 G-T y -2086 A-T) confieren alto

riesgo al desarrollo de la infección por citomegalovirus (Loeffler J, et al, 2006). En el año 2010 fue reportado un estudio realizado en población Española donde se reportó que SNPs del *CCR5* (*CCR5*Δ32 y *CCR5*-rs1799988) no contribuyen al riesgo de desarrollar soriasis o su complicación a artritis soriática.

4. JUSTIFICACION

El hecho de que solo un pequeño porcentaje de individuos infectados desarrolle la EC, lleva a destacar el papel del componente genético en el desarrollo de la patología. La susceptibilidad genética al desarrollo de la CCC es compleja y poligénica, ya que es el producto de la suma del efecto moderado de múltiples loci y variantes genéticas y su interacción con el parásito y factores ambientales, determinando la susceptibilidad o resistencia a desarrollar la enfermedad. La identificación de los genes y haplotipos implicados en la EC, podría ayudar en un futuro a tener un tratamiento personalizado para los pacientes que tengan riesgo de desarrollarla y aquellos que ya la sufran.

El papel de CCR5 durante la infección con *T. cruzi* ha sido estudiado tanto en humanos como en ratones. Estos estudios han revelado un incremento en los niveles de los ligandos de CCR5: CCL3, CCL4 y CCL5, en los corazones de ratones infectados con *T. cruzi*. Así mismo, fue detectado un aumento en la expresión de CCR5 en leucocitos de pacientes con CCC. Ratones CCR5^{-/-} han mostrado ser más susceptibles a la infección por *T. cruzi* comparado con los ratones de tipo salvaje, donde se evidenció una inflamación reducida e incremento del parasitismo. En humanos se reportó que la frecuencia de linfocitos CD4⁺ CD25⁺ y las células NK fue mayor en pacientes en la fase indeterminada que en los pacientes con cardiomiopatía chagásica (Vitelli-Avelar, *et al*, 2005). Trabajos posteriores en pacientes con CCC reportaron que el infiltrado linfocitario está conformado principalmente por linfocitos T con un predominio de CD8⁺, pero también en menor proporción CD4⁺ y macrófagos (Cuhna-Neto E, *et al*, 2009). El infiltrado inflamatorio es accionado por quimiocinas que determinan el tipo de células presentes en el tejido. Estos hallazgos implican a CCR5 en el desarrollo activo de miocarditis durante la infección por *T. cruzi*.

En este sentido, variantes génicas del gen *CCR5* han sido estudiadas como posibles biomarcadores de CCC en población Brasileña, Peruana y Venezolana. En Colombia, el Grupo de Inmunología y Epidemiología Molecular, GIEM en el cual se encuentra enmarcada esta propuesta, ha descrito asociaciones con polimorfismos funcionales del tipo de nucleótido simple (SNP), en genes de citoquinas pro-inflamatorias como IL1 beta, IL12 beta, IFN gama, MIP y CCL5 (RANTES). Si bien ya se tienen reportes acerca del gen *CCR5*, con el presente estudio se aumentó el tamaño de la muestra, se han utilizado pacientes nuevos, se han determinado haplotipos y un análisis de estadios de severidad en aquellos pacientes que presentan CCC, para compararlo con lo anteriormente reportado por nosotros y por otros grupos.

Por la importancia del receptor *CCR5* en la patogenia de la enfermedad, esta propuesta plantea analizar la asociación de variantes génicas y haplotipos del gen *CCR5* con el desarrollo de la CCC. Este conocimiento sería relevante para el desarrollo de medidas preventivas, terapéuticas y estrategias de intervención multidisciplinarias en la reducción de la morbi-mortalidad de origen cardiovascular de estos pacientes, disminuyendo los gastos del sistema de salud utilizados en la atención hospitalaria, así como también el impacto a nivel económico y social por la afección de los individuos en etapa productiva.

5. OBJETIVOS

5.1 OBJETIVO GENERAL

Determinar si existe asociación entre las variantes génicas rs2856758, rs2734648, rs1799987, rs1799988, rs41469351, rs1800023, rs1800024 presentes en el gen *CCR5* y sus haplotipos con el desarrollo de CCC en individuos provenientes de zona endémica de Santander.

5.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Determinar las frecuencias alélicas y genotípicas de los polimorfismos del gen *CCR5* en pacientes con CCC y asintomáticos provenientes de zona endémica de Santander.
- Determinar el desequilibrio de ligamiento entre los polimorfismos analizados y la presencia de haplotipos.
- Establecer la asociación de los polimorfismos del gen *CCR5* o sus haplotipos con el desarrollo de cardiomiopatía chagásica crónica.

6. MATERIALES Y METODOS

6.1 POBLACIÓN DE ESTUDIO

Se llevó a cabo un estudio analítico poblacional utilizando el diseño de casos y controles donde se evaluaron las diferencias entre las frecuencias alélicas y genotípicas de los polimorfismos del gen CCR5, en pacientes seropositivos a antígenos de *T. cruzi*. El estudio incluyó 442 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 *T. 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 Mundial de la Salud (Tabla 4). 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=236, edad promedio: 58 años). Los pacientes sin alteraciones cardíacas demostradas por evaluación clínica y por pruebas electrocardiográficas fueron clasificados como asintomáticos y representaron el grupo control (n=206, edad promedio: 49 años).

Tabla 3. Clasificación de los pacientes según grados de severidad de la cardiopatía - OMS

Grado I	Infección chagásica sin compromiso clínico. No se encuentran alteraciones electrocardiográficas y ecocardiográficas.
Grado II	Infección chagásica con sintomatología de moderada a nula. Se encuentran alteraciones electrocardiográficas pero no alteraciones ecocardiográficas.
Grado III	Infección chagásica con sintomatología pronunciada con insuficiencia cardiaca. Se encuentran alteraciones electrocardiográficas y ecocardiográficas.

Rutinariamente, a todos los pacientes se les llenó 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 (UIS) y de la Fundación Cardiovascular de Colombia (FCV) y está anidado en un proyecto financiado por Colciencias titulado: Valor pronóstico de los polimorfismos del Factor de Necrosis Tumoral alfa y del receptor de quimioquinas CCR5 en adultos Colombianos con cardiopatía chagásica crónica (Estudio Centauro).

Se analizaron 7 polimorfismos del gen *CCR5* ubicados en el cromosoma 3 posición 3p21.31 (46.411.633 – 46.417.69 pb). Este gen codifica para el receptor CCR5 que es el principal receptor celular de la proteína CCL5 (RANTES), los cuales están implicados en la patogénesis de la enfermedad.

6.2 CRITERIOS DE INCLUSIÓN Y EXCLUSIÓN PARA EL GRUPO DE CASOS

6.2.1 Criterios de inclusión

- Pacientes mayores de 18 años.
- Pacientes con serología positiva para anticuerpos contra *T. cruzi*.
- Vivir por más de 10 años en zona endémica
- Tener sintomatología clínica, electro o ecocardiograma compatible con cardiomiopatía chagásica.

6.2.2 Criterios de exclusión

- Diagnóstico previo de otras causas de cardiopatía dilatada (hipertensiva, isquémica, viral, idiopática, arrítmica, valvular).
- El no deseo de participar en el estudio o no firmar del consentimiento informado.
- Cualquier enfermedad diferente a la CCC que disminuya la expectativa de vida a menos de 5 años.
- Enfermedad reumatológica o autoinmune.

6.3 CRITERIOS DE INCLUSIÓN PARA EL GRUPO CONTROL

6.3.1 Criterios de inclusión

- Pacientes mayores de 18 años.
- Pacientes con serología positiva para anticuerpos contra *T. cruzi*.
- Vivir por más de 10 años en zona endémica
- No tener sintomatología clínica o electrocardiográfica compatible con cardiomiopatía chagásica.

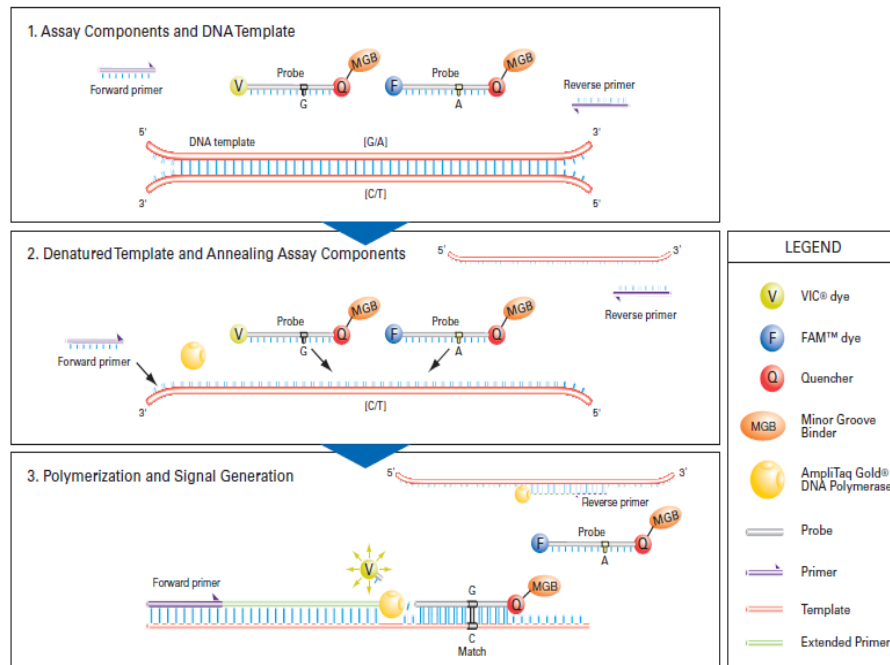
6.4 SELECCIÓN DE LOS POLIMORFISMOS

En el gen *CCR5* se han descrito 10 loci bialélicos, se analizaron los 7 polimorfismos que dan lugar a los 7 haplotipos más frecuentes y corresponden a rs2856758 (-2733), rs2734648 (-2554), rs1799987 (-2459), rs1799988 (-2135), rs41469351 (-2132), rs1800023 (-2086), rs1800024 (-1835). Adicionalmente se tuvieron en cuenta las frecuencias alélicas mínimas (FAM) >5% en población Hispana, Caucásica y/o Afro-Americana, según lo reportado en la base de datos de HapMap.

6.5 GENOTIPIFICACIÓN DE POLIMORFISMOS

La genotipificación se realizó mediante RT-PCR utilizando sondas Taq-Man, tecnología de Applied Biosystems. Para llevar a cabo esta detección se utiliza un fragmento de ADN (sonda) complementario a la región del ADN que queremos amplificar. Esta sonda lleva adherida una molécula fluorescente (extremo 5') y otra molécula que inhibe esta fluorescencia ("quencher") en el extremo 3', de tal forma que sólo cuando la sonda es desplazada de su sitio por acción de la ADN polimerasa la molécula fluorescente se libera de la acción del "quencher" y emite fluorescencia al ser excitada con un láser. La cuantificación de la fluorescencia emitida durante cada ciclo de la PCR será proporcional a la cantidad de ADN que se está amplificando (Applied Biosystems, 2010).

Figura 15. Ensayo de genotipificación de SNPs



Fuente: Tomado de: Protocolo Applied Biosystem. 2010.

6.6 ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Se compararon las frecuencias alélicas y genotípicas entre pacientes asintomáticos, sintomáticos y sus estadios de severidad para identificar la presencia de asociaciones genotipo-fenotipo enfermedad, mediante la prueba de χ^2 (chi-cuadrado). Un valor de $p < 0.05$ fue considerando como estadísticamente significativo. El efecto genético de cada polimorfismo fue evaluado por modelos de regresión logística para estimar las razones de posibilidades (OR) con 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 (Purcell S, et al, 2007). Se analizaron patrones de DL (D' y r^2) alrededor de los SNPs y se determinaron bloques de haplotipos usando el software Haploview 4.2 (Barrett JC, et al, 2005).

6.7 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

7.1. ANÁLISIS DE LA POBLACIÓN

7.1.1. Variables del estudio

7.1.1.1. Variables demográficas

Los participantes en el estudio provenían de municipios de las provincias guanentina y comunera (zonas de alta endemicidad) (Gutierrez et al., 2004), manifestaron su conocimiento de los vectores y las condiciones socioeconómicas de los grupos fueron similares: viviendas ubicadas en zona rural, construidas en bahareque o tapia pisada. La distribución por edad y género fue similar entre el grupo de casos y controles. En la tabla 4 se muestra la información de los pacientes relacionada con edad y género.

Tabla 4. Características demográficas de la población en estudio

	Género		Edad en años	
	Masculino	Femenino	Rango	Promedio
Control (n:206)	83 40%	123 60%	(18 - 80)	49
Caso (n:236)	115 49%	121 51%	(25 - 82)	58

7.1.1.2. Variables serológicas

Todos los individuos se diagnosticaron seropositivos para antígenos de *T. cruzi* por las pruebas de ELISA y HAI.

7.1.1.3. Variables clínicas

La clasificación para evaluar la gravedad de la infección chagásica se realizó según los criterios establecidos por la OMS. Esta clasificación define tres fases de la enfermedad, denominadas Fase I, II, III (Tabla 3).

De acuerdo a la clasificación de la OMS los pacientes se distribuyeron en fase I asintomáticos y en las fases II, III los sintomáticos (Tabla 5).

Tabla 5. Población de estudio según la gravedad de la cardiomiopatía chagásica

Fases	N° de pacientes por fase	Porcentaje
Fase I	206	47
Fase II	132	30
Fase III	104	23
Total	442	100

7.1.1.4 Estructura poblacional

La población de esta región no presenta concentración de grupos étnicos. El coeficiente de Wright mostró que la población no está estructurada. Según Hartl & Clark (1997), los valores de FST por debajo de 0,05 son evidencia de poca estructura poblacional.

7.1.1.5 Equilibrio de Hardy-Weinberg

Las frecuencias alélicas y genotípicas de los pacientes asintomáticos y de los sintomáticos se encontraron en Equilibrio de Hardy-Weinberg (EHW) en todos los polimorfismos analizados.

7.2 ANÁLISIS DE ASOCIACIÓN ALÉLICA Y GENOTÍPICA

Se analizaron 7 polimorfismos del gen *CCR5* que corresponden a los rs2856758 (-2733), rs2734648 (-2554), rs1799987 (-2459), rs1799988 (-2135), rs41469351 (-2132), rs1800023 (-2086), rs1800024 (-1835). Se determinó la frecuencia alélica y genotípica en el grupo de asintomáticos y sintomáticos. De igual manera se calculó la *P* y el OR con un IC del 95%. Los resultados no mostraron diferencias estadísticamente significativas (Tabla 6).

Se determinó la frecuencia alélica y genotípica en el grupo de sintomáticos con los diferentes estadios de severidad. Para este análisis se calculó la *P* y el OR con un IC del 95%. Los resultados mostraron diferencias estadísticamente significativas en la distribución de frecuencias genotípicas de SNPs para los rs1799987 (-2459) G/T ($p=0.033$; OR=1.75 (1.010-3.054)), rs1799988 (-2135) C/T ($p=0.014$; OR=1.91 (1.09-3.33)) y rs1800023 (-2086) A/G ($p=0.008$; OR=2.02 (1.16-3.53)) como lo muestra la tabla 7.

Tabla 6. Frecuencias alélicas y genotípicas de los SNPs del gen CCR5 en pacientes asintomáticos y con cardiomiopatía chagásica

SNPs/Gen CCR5		Asintomáticos		Sintomáticos		P	OR	IC 95%
		n: 206	%	n: 236	%			
rs2856758 (-2733)	AA	154	74.8	184	78.0	0.43	1.20	0.752-1.899
	AG	48	23.3	52	22.0	0.75	0.93	0.581-1.489
	A/G	4	1.9	0	0.0	0.03	0.00	0.0-1.326
	A	356	86.4	420	89.0	0.24	1.27	0.83-1.938
	G	56	13.6	52	11.0	0.24	0.79	0.516-1.201
rs2734648 (-2554)	GG	84	40.8	86	36.4	0.35	0.83	0.557-1.245
	GT	98	47.6	115	48.7	0.81	1.05	0.708-1.550
	G/T	24	11.7	35	14.8	0.33	1.32	0.731-2.392
	G	266	64.6	287	60.8	0.25	0.85	0.641-1.130
	T	146	35.4	185	39.2	0.25	1.17	0.885-1.559
rs1799987 (-2459)	AA	74	35.9	73	30.9	0.27	0.80	0.527-1.211
	AG	103	50.0	117	49.6	0.93	0.98	0.665-1.454
	A/G	29	14.1	46	19.5	0.13	0.48	0.864-2.534
	A	251	60.9	263	55.7	0.12	0.81	0.61-1.066
	G	161	39.1	209	44.3	0.02	1.24	0.938-1.636
rs1799988 (-2135)	CC	76	36.9	77	32.6	0.35	0.83	0.549-1.250
	CT	101	49.0	112	47.5	0.74	0.94	0.635-1.389
	C/T	29	14.1	47	19.9	0.11	1.52	0.889-2.598
	C	253	61.5	266	59.4	0.13	0.81	0.614-1.072
	T	159	38.6	206	43.6	1.13	1.23	0.933-1.628
rs41469351 (-2132)	CC	205	99.5	235	99.6	0.92	1.15	0.031-42.170
	CT	1	0.5	1	0.4	0.92	0.87	0.024-32.090
	C/T	0	0.0	0	0.0	1.00	—	—
	C	411	99.8	471	99.8	0.92	1.15	0.031-41.984
	T	1	0.2	1	0.2	0.92	0.87	0.024-31.969
rs1800023 (-2086)	AA	85	41.3	86	36.4	0.30	0.82	0.546-1.220
	AG	99	48.1	113	47.9	0.97	0.99	0.671-1.469
	A/G	22	10.7	37	15.7	0.12	1.56	0.854-2.842
	A	269	65.3	285	60.4	0.13	0.81	0.610-1.076
	G	143	34.7	187	39.6	0.13	1.23	0.929-1.639
rs1800024 (-1835)	CC	128	62.1	154	65.3	0.50	1.14	0.761-1.720
	CT	62	30.1	72	30.5	0.93	1.02	0.665-1.563
	C/T	15	7.3	10	4.2	0.17	0.56	0.229-1.368
	C	318	77.6	380	80.5	0.23	1.22	0.872-1.710
	T	92	22.4	92	19.5	0.30	0.84	0.601-1.181

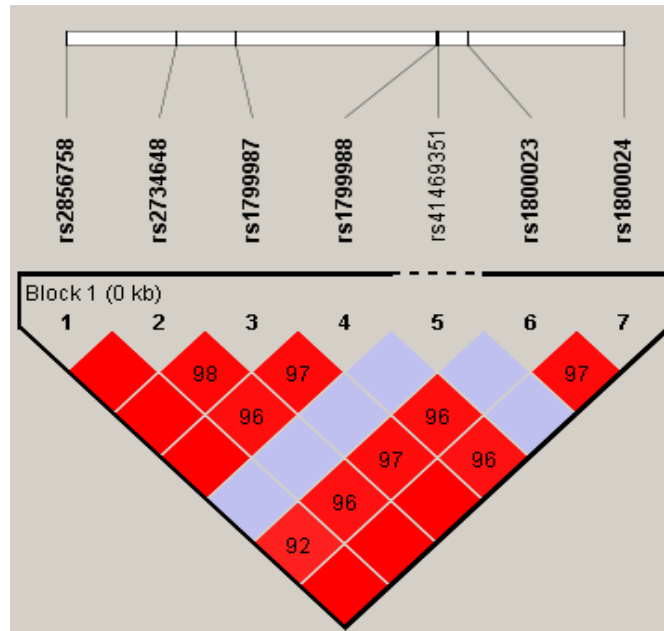
Tabla 7. Frecuencias alélicas y genotípicas de los SNPs del gen CCR5 en pacientes con cardiomiopatía chagásica y grados de severidad

SNPs/Gen CCR5		Estadio II		Estadio III		P	OR	IC 95%
		n: 132	%	n: 104	%			
rs2856758 (-2733) A/G	AA	99	75.6	82	78.9	0.49	1.42	0.644-2.403
	AG	32	24.4	20	19.2	0.36	0.74	0.378-1.460
	GG	0	0.0	2	1.9	0.11	—	—
	A	230	87.8	184	88.5	0.82	1.07	0.586-1.946
	G	32	12.2	24	11.5	0.82	0.94	0.514-1.706
rs2734648 (-2554) G/T	GG	52	39.7	31	29.8	0.13	0.65	0.364-1.169
	GT	60	45.8	61	58.7	0.04	1.70	0.980-2.961
	TT	19	14.5	12	11.5	0.52	0.78	0.334-1.786
	G	164	62.6	123	59.1	0.45	0.87	0.585-1.278
	T	98	37.4	85	40.9	0.45	1.16	0.783-1.709
rs1799987 (-2459) A/G	AA	46	35.1	28	26.9	0.19	0.69	0.377-1.254
	AG	59	45.0	61	58.7	0.03	1.76	1.010-3.054
	GG	26	19.9	15	14.4	0.29	0.69	0.323-1.449
	A	151	57.6	117	56.3	0.76	0.95	0.643-1.388
	G	111	42.4	91	43.8	0.76	1.06	0.720-1.554
rs1799988 (-2135) C/T	CC	50	38.2	29	27.9	0.11	0.63	0.350-1.145
	CT	55	42.0	60	57.7	0.01	1.91	1.097-3.326
	TT	26	19.9	15	14.4	0.29	0.69	0.323-1.449
	C	155	59.2	118	56.7	0.60	0.91	0.615-1.331
	T	107	40.8	90	43.3	0.60	1.11	0.751-1.625
rs41469351 (-2132) C/T	CC	130	99.2	103	99.0	0.71	1.59	0.111-44.788
	CT	1	0.8	1	1.0	0.87	1.27	0.034-47.135
	TT	0	0.0	0	0.0	1.00	—	—
	C	261	99.6	207	99.5	0.87	0.79	0.022-29.164
	T	1	0.4	1	0.5	0.87	1.26	0.034-46.364
rs1800023 (-2086) A/G	AA	54	41.2	31	29.8	0.08	0.61	0.343-1.096
	AG	57	43.5	63	60.6	0.01	2.02	1.160-3.531
	GG	20	15.3	10	9.6	0.21	0.60	0.246-1.421
	A	165	63.0	125	60.1	0.52	0.89	0.598-1.310
	G	97	37.0	83	39.9	0.52	1.13	0.763-1.671
rs1800024 (-1835) C/T	CC	89	67.9	63	60.6	0.28	0.74	0.419-1.314
	CT	34	26.0	36	34.6	0.14	1.53	0.838-2.782
	TT	8	6.1	5	4.8	0.68	0.78	0.215-2.745
	C	162	80.9	212	77.9	0.42	0.83	0.517-1.334
	T	46	19.1	50	22.1	0.42	1.20	0.749-1.934

7.3 ANÁLISIS DE DESEQUILIBRIO DE LIGAMIENTO

El análisis de desequilibrio de ligamiento de los SNPs estudiados reveló un fuerte nivel de DL ($D' > 0.92$) entre los SNPs del gen *CCR5*, a excepción del SNP rs41469351 que no estuvo en DL con ninguno de los otros 6 SNPs (Figura 16).

Figura 16. Desequilibrio de ligamiento de la región 3p21.31 correspondiente al gen *CCR5*.



Se analizaron patrones de DL ($r^2 > 0.8$) alrededor de los SNPs y se determinaron bloques de haplotipos con el método de Gabriel *et al.*, usando el software Haploview 4.2 (Barrett *et al.*, 2005). Se generaron 5 haplotipos formados por 6 SNPs (-2733, -2554, .2459, -2135, -2086, -1835). No se encontraron diferencias estadísticamente significativas en la distribución de los haplotipos comparando los pacientes con CCC y los pacientes asintomáticos. (Tabla 8).

El análisis de haplotipos entre el grupo de pacientes sintomáticos, es decir, los que presentaban cardiomiopatía chagásica crónica con sus diferentes estadios de severidad, generó 5 haplotipos formado por 5 SNPs (-2554, -2459, -2135, -2086, -1835). Ninguno de los haplotipos mostró diferencias estadísticamente significativas. (Tabla 9).

Tabla 8. Análisis de haplotipos en pacientes asintomáticos y con CCC.

SNPs						Frecuencia (%)		P	OR	IC 95%
-2733	-2554	-2459	-2135	-2086	-1835	Controles	Casos			
A	T	G	T	G	C	33,7	38,1	0,174	1,21	0,91 - 1,61
A	G	A	C	A	C	24,8	25,3	0,820	1,04	0,75 - 1,42
A	G	A	C	A	T	21,6	18,5	0,239	0,82	0,58 - 1,15
G	G	A	C	A	C	13,1	10,8	0,291	0,8	0,52 - 1,23
A	G	G	T	A	C	2,9	4,2	0,293	1,47	0,67 - 3,35

Tabla 9. Análisis de haplotipos en pacientes con CCC y diferentes grados de severidad

SNPs					Frecuencia (%)		P	OR	IC 95%
-2554	-2459	-2135	-2086	-1835	Estadio III	Estadio II			
T	G	T	G	C	38,9	35,5	0,44	1,16	0.78-1.72
G	A	C	A	C	33,8	38,7	0,27	0,81	0.54-1.20
G	A	C	A	T	21,4	18,5	0,43	1,20	0.74-1.94
G	G	T	A	C	2,4	4,2	0,29	0,56	0.17-1.79
T	G	T	A	C	1,5	0,8	0,48	1,90	0.26-16.41

8. DISCUSION

Los mecanismos fisiopatológicos y moleculares involucrados en el desarrollo de la Enfermedad de Chagas (EC) aún no se conocen completamente, sin embargo, existe evidencia que la patogénesis de la EC, sería 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 (Dutra et al., 2009).

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 son inherentes al genoma del parásito y otros están relacionados con la constitución genética del hospedero.

Estudios experimentales en donde se han evaluado los receptores de quimiocinas, han reportado que éstos pueden contribuir al daño del tejido cardiaco observado en la CCC (Cunha-Neto E, et al, 2009. Medeiros GA, et al, 2009. Marrino AP, et al, 2005. Talvani A, et al, 2004. Coelho PS, et al, 2002. Manque PA, et al, 2011). El receptor de quimiocinas CCR5 cumple un papel muy importante en la fase inicial de la infección para controlar el parásito y además, en la inducción de la actividad tripanocida, vía óxido nítrico, por los macrófagos (Aliberti et al 1999).

El aumento en la producción local de citocinas CCL5, CCL3 y CCL4 que ocurre durante la infección por *T. cruzi*, puede conducir a la migración selectiva de linfocitos Th1 hacia los tejidos afectados, expresando CCR5 (Colantonio et al 2004). Por consiguiente, el nivel de expresión en membrana de CCR5 podría

determinar no sólo la cantidad y tipo de células en los órganos infectados, sino además, el grado de respuesta inflamatoria a la infección con *T. cruzi*. De hecho, se ha observado que la ocurrencia de miocarditis está correlacionada con la severidad clínica, los pacientes asintomáticos tienen poca inflamación, mientras los pacientes con CCC avanzada exhiben una respuesta inflamatoria permanente e intensa (Correa, *et al*, 1999). De esta manera el aumento en el reclutamiento y quimiotaxis de linfocitos Th1 debido a un incremento en la expresión de CCR5, aumenta la respuesta inmune crónica en contra del parásito y el grado de daño tisular, lo cual está relacionado con el desarrollo de las formas severas de la CCC.

Nogueira y colaboradores reportaron células mononucleares expresando CCR5 en el miocardio de pacientes con CCC, además, este estudio mostró que los niveles de expresión de CCR5 fueron significativamente más altos en el tejido de miocardio con CCC que en pacientes con cardiomiopatías no inflamatorias y donadores normales. Por otra parte, existe evidencia en modelos murinos, en donde la infección con *T. cruzi* estuvo acompañada de un incremento en la expresión de CCR5 y los ratones CCR5^{-/-} tuvieron niveles más altos de parasitemia (Machado *et al*, 2005). En este sentido, el gen CCR5 es un candidato atractivo como factor genético del hospedero relacionado con la susceptibilidad y/o desarrollo de CCC.

Los resultados de este trabajo sugieren que el genotipo heterocigoto de los SNPs rs1799987 (-2459 G/A), rs1799988 (-2135 C/T) y rs1800023 (-2086 A/G), están asociados con un aumento en el riesgo a desarrollar las formas severas de la CCC.

En relación con la variante rs1799987 (-2459 G/A), localizada dentro del promotor (P1), ha sido asociada con variaciones en la expresión *in vitro*, aunque con resultados controversiales de acuerdo al tipo de célula estudiada. Diversos estudios han reportado que el alelo G del SNP rs1799987 tiene una actividad del

promotor *in vitro* más baja que el alelo A y que el genotipo AA lleva a mayor expresión del gen *CCR5* en células T CD8⁺. (Abdi et al 2002, Shieh et al, 2000. McDermott et al, 1998). Estudios realizados en población peruana evidenciaron una frecuencia significativa del genotipo heterocigoto A/G y la presencia del alelo G en pacientes asintomáticos con respecto a los pacientes con CCC, mostrando un efecto protector del alelo G con el desarrollo de CCC, sugiriendo que esto sería resultado de una expresión disminuida de *CCR5* (Calzada, et al, 2001, Fernandez-Mestre, et al, 2004). Nuestra evidencia experimental no mostró diferencias significativas de asociación entre este SNP y protección. En contraste, el genotipo heterocigoto A/G se encontró en mayor frecuencia en los individuos con CCC estadio III. Sin embargo, vale la pena resaltar las diferencias de las frecuencias del genotipo heterocigoto A/G en las distintas poblaciones, siendo de 18,8% en el grupo peruano estudiado, mientras en población venezolana 29,6% en pacientes con CCC y en pacientes asintomáticos 41,5% y 23,5%, respectivamente. En nuestro estudio la frecuencia fue de 49,6% en pacientes con CCC, mientras que en los asintomáticos fue de 50%. Estas discrepancias en los resultados de los estudios de asociación podrían estar dadas por diferencias étnicas entre las poblaciones analizadas, así como también por el tamaño de muestra empleada en los estudios previos.

El análisis del polimorfismo rs1799988 (-2135) en nuestra población mostró una asociación significativa del genotipo heterocigoto C/T con las formas severas de la CCC. Un estudio reciente en población brasilera mostró que tanto el alelo C como el genotipo CC del SNP rs1799988, fueron significativamente más frecuentes en el grupo con CCC severa. En este estudio también se evaluó la expresión del RNAm de *CCR5*, siendo mayor en el miocardio de pacientes con CCC comparada con pacientes con cardiomiopatía no inflamatoria, lo cual está en línea con la identificación de células mononucleares CCR5⁺ en el tejido miocárdico con CCC (Nogueira et al, 2012). No existe evidencia experimental en donde se asocie esta variante con funcionalidad y dado que este SNPs se encuentra en la región 5'UTR

podría estar influenciando un aumento en los niveles de RNAm, lo que se traduce en una elevada expresión del receptor CCR5 el cual es importante en la patogénesis de la EC como se describió anteriormente, en donde, el aumento de la expresión de este receptor está relacionado con el daño del miocardio característico de los pacientes con CCC. De esta manera, con el fin de dilucidar el papel que desempeña este SNPs en EC, se hacen necesarios estudios funcionales de esta variante génica.

En relación a la asociación encontrada con el genotipo A/G del SNP rs1800023 (-2086), hasta el momento no se ha reportado ninguna asociación de este SNP con EC. Un estudio realizado en población Norteamericana, reportó que el alelo A de esta variante estuvo asociado con alto riesgo a desarrollar enfermedad por citomegalovirus humano. Esta variante podría estar en desequilibrio de ligamiento con otras(s) variantes funcionales no identificadas dentro del gen *CCR5*. Aunque los estudios de asociación de polimorfismos individuales en susceptibilidad a la infección por *T. cruzi* y al desarrollo de CCC, proporcionan información útil, no siempre es posible identificar la causa del efecto observado de un determinado polimorfismo, ya que diferentes combinaciones de polimorfismos pueden estar en desequilibrio de ligamiento formando haplotipos. Por consiguiente, es importante tener en cuenta, la combinación de esos polimorfismos y haplotipos con otros y su prevalencia en todo el gen para definir el papel de estos en la patogénesis de la CCC. Probablemente se requiera el análisis de un mayor número de variantes funcionales que estén afectando de manera conjunta la expresión de la proteína para poder tener resultados más concluyentes.

Es importante tener en cuenta que en estudios de genómica humana donde el diseño del estudio corresponde a casos y controles, requiere ciertos parámetros que se deben tener en cuenta, por lo tanto es necesario determinar que la población no esté estructurada y que ambos grupos de pacientes pertenecen a una misma unidad genética poblacional para evitar falsos positivos. Otro factor

importante es la selección adecuada 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. Variables como edad y género también fueron tenidas en cuenta para evitar confusión.

Recientemente, en población Colombiana, el Grupo de Investigación de Inmunología y Epidemiología Molecular-GIEM, encontró diferencias estadísticamente significativas en la distribución del haplogrupo humano (HH)-A. Además se evidenció que el alelo G del SNP CCR5-2733 (rs2856758) y el alelo T del SNP CCR5-2554 (rs2734648), estuvieron asociados con un riesgo reducido a la susceptibilidad y aumento del riesgo a desarrollar las formas severas de CCC, respectivamente (Flórez O, *et al*, 2012). El resultado obtenido en el presente trabajo no replica la asociación determinada en el estudio previo, la causa de tales inconsistencias posiblemente se deba que el efecto de estos polimorfismos individuales es bajo en el riesgo de enfermedad.

En estudios de gen candidato la asociación de una variante con el fenotipo puede verse afectada por el tamaño de la población, por lo tanto un tamaño de población mayor puede obtener valores de asociación con mayor significancia que den mayor solidez a los resultados. Por lo tanto, se hacen necesarios estudios con tamaño de muestra mayor para confirmar nuestros resultados (Balding DJ, 2006).

9. CONCLUSION

Se analizaron 7 polimorfismos del gen *CCR5* que corresponden a los rs2856758 (-2733), rs2734648 (-2554), rs1799987 (-2459), rs1799988 (-2135), rs41469351 (-2132), rs1800023 (-2086), rs1800024 (-1835), de los cuales se identificaron 3 SNPs correspondientes a los rs1799987 (-2459), rs1799988 (-2135) y rs1800023 (-2086), con diferencias estadísticamente significativas en la distribución de frecuencias genotípicas asociadas con el desarrollo de la CCC y sus estadios de severidad.

El genotipo G/A del SNPs rs1799987 (-2459) se encontró con mayor frecuencia en el grupo de individuos que desarrollaron CCC estadio III, comparado con el grupo de individuos pertenecientes al estadio II, siendo esta diferencia estadísticamente significativa, por lo que se sugiere estaría asociado con un aumento en la severidad de la CCC.

El genotipo C/T del rs1799988 (-2135) mostró diferencia estadísticamente significativa al comparar el grupo pacientes con CCC y los diferentes grados de severidad, reportando una mayor frecuencia en este último, lo que sugiere una asociación con el desarrollo CCC severa.

El genotipo A/G del SNPs rs1800023 (-2086) se encontró con mayor frecuencia en el grupo de individuos que desarrollaron CCC estadio III, comparado con el grupo de individuos que desarrollar CCC estadio II, siendo esta diferencia estadísticamente significativa, por lo que se sugiere estaría asociado con el desarrollo de las formas severas de la CCC.

En el análisis de DL se generaron 5 bloques de haplotipos formados por 6 SNPs (-2733, -2554, .2459, -2135, -2086, -1835), en los cuales no se encontraron diferencias estadísticamente significativas en la distribución de los haplotipos comparando los pacientes asintomáticos y los pacientes con CCC.

El análisis de haplotipos entre el grupo de pacientes sintomáticos con sus diferentes estadios de severidad, generó 5 haplotipos formados por 5 SNPs (-2554, -2459, -2135, -2086, -1835). Ninguno de los haplotipos mostró diferencias estadísticamente significativas.

10. RECOMENDACIONES

Ampliar el número de polimorfismos, con el fin de identificar asociaciones débiles y confirmar las obtenidas, incluyendo variantes funcionales que podrían estar afectando de manera conjunta la expresión de la proteína y definir haplotipos con este mayor número de variantes.

Aumentar el número poblacional para confirmar las asociaciones obtenidas e identificar asociaciones débiles.

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

Hacer estudios de funcionalidad de los polimorfismos analizados con el fin identificar su papel en la patogénesis de la EC.

Hacer el seguimiento a la población estudiada para definir el valor pronóstico de los polimorfismos.

BIBLIOGRAFIA

Abel, LC, et al. Chronic Chagas' disease cardiomyopathy patients display an increased IFN-gamma response to *Trypanosoma cruzi* infection. *J Autoimmun* Aug, 2001, vol. 17, no. 1, p. 99-107.

Aguilar F, et al. Chemokine receptor CCR2/CCR5 polymorphism in Spanish patients with systemic lupus erythematosus. *J Rheumatol*. 2003; 30:1770–4.

Alberti JC, et al. Beta-Chemokines enhance parasite uptake and promote nitric oxide-dependent microbiostatic activity in murine inflammatory macrophages infected with *Trypanosoma cruzi*. *Infect Immun*. 1999 Sep; 67 (9): 4819-26.

Ali JM, et al. Molecular genetic studies of complex phenotypes. *Translational Research*. 2011.159:2:64-79

Aliberti JCS, Machado FS, Souto JT et al. B-chemokines enhance parasite uptake and promote nitric oxide-dependet microbiostatic activity in murine inflammatory macrophages infected with *Trypanosoma cruzi*. *Inf Immun* 1999: 67: 4819-26

Araujo FE, et al. Potential roleof CD4+ CD25 HIGH regulatory T cells in morbidity in Chagas disease. *Front Biosci*. 2007. 12:2097/2806.

Bajetto A, et al. Characterization of chemokines and their receptor in the central nervous system: physiopathological implications. *Jurnal Neurochem*. 2002 Sep; 82 (6): 1311-29.

Baker AR, et al. Genetic susceptibility to tuberculosis associated with cathepsin Z haplotype in a Ugandan household contact study. *Human immunology* May, 2011, vol. 72, no. 5, p. 426-30.

Balding DJ. A tutorial on statistical methods for population association studies. *Nature review. Genetics*. Oct, 2006, vol.7, 10:781-91.

Barrett JC, et al. Genome-wide association study and meta-analysis find that over 40 loci affect risk of type 1 diabetes. *Nature genetics* Jun, 2009, vol. 41, n. 6, p.703-707.

Barrett JC, Fry B, Maller J, Daly M.J. Haploview: analysis and visualization of LD and haplotype maps. *Bioinformatics*. 2005. 21:263-265.

Benhamous S, Lee WJ, Alexandrie AK, Boffeta P, Bonchardy C, Butkiewicz P, et al. Meta and pooled analyses of the effects of glutathione S-transferase M1 polymorphisms and smoking on lung cancer risk. *EN Carcinogenesis*. 2002, 23. 1343-1350.

Bilate MB, Cunha-Neto E. Chagas Disease Cardiomyopathy: Current Concepts of an Old Disease. *Rev. Inst. Med. Trop. S. Paulo*, 2008. 50(2): p. 67-74.

Bilate MB., et al., The Syrian hamster as a model for the dilated cardiomyopathy of Chagas' disease: a quantitative echocardiographical and histopathological analysis. *Microbs Infect*, 2003. 5: p. 1116-1124.

Calzada JE, Beraun Y, Gonzales CI, Martin J. Transforming growth factor beta 1 (TGFbeta1) gene polymorphisms and Chagas disease susceptibility in Peruvian and Colombian patients. *Cytokine*. 2009; 45:149-153.

Calzada JE, Nieto A, Beraún Y, Martín J. Chemokine receptor CCR5 polymorphisms and Chagas' disease cardiomyopathy. *Tissue Antigens*.2001; 58(3):154-188

Campos MA., and Gazzinelli RT. Trypanosoma cruzi and its components as exogenous mediators of inflammation recognized through Toll-like receptors. *Mediators Inflamm Jun*, 2004, vol. 13, no. 3, p. 139-43.

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.

Castellucci L, et al. FLI1 polymorphism affects susceptibility to cutaneous leishmaniasis in Brazil. *Genes and immunity Oct*, 2011, vol. 12, no. 7, p. 589-94.

Castillo-Riquelme M, et al. The costs of preventing and treating Chagas disease in Colombia. *Plos Negl Trop Dis*. 2008;2(11):336.

Chang HY, et al. Association between CCR5 promoter polymorphisms and hepatitis B virus infection Korean. *J Hepatol*. 2005; 11:116–24.

Chessler AD, et al. Trypanosoma cruzi triggers an early type I IFN response in vivo at the site of intradermal infection. *J Immunol Feb 15*, 2009, vol. 182, no. 4, p. 2288-96.

Choi WT, et al. Biology and clinical relevance of chemokines and chemokine receptors CXCR4 and CCR5 in human diseases. *Exo Biol Med*. 2011;236(6):637-47

Coelho PS, et al. Glycosylphosphatidylinositol-anchored mucin-like glycoproteins isolated from Trypomastigotes induce in vivo leukocyte recruitment dependent on MCP-1 production by IFN-gamma primed macrophages. *Leukoc Biol*. 2002 May; 71 (5): 837-44.

Colantonio L, Iellem A, D'Ambrosio D. Chemotactic profiling of lymphocyte subpopulations. *Methods Mol Biol*. 2004;239:45-52.

Cordero P, et al. Whole-Genome sequencing in personalized therapeutics. *Clinical Pharmacology & Therapeutics*. 2012(9):1001-9

Correa-Oliveira R, Gomes Jd, Lemos EM et al. The role of the immune response on the development of severe clinical forms of human Chagas disease. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 1999; 94 (Suppl 1): 253-5

Coura JR. Chagas disease: what is known and what is needed--a background article. *Mem Inst Oswaldo Cruz* Oct 30, 2007, vol. 102 Suppl 1, no., p. 113-22.

Cunha-Neto E, et al. Immunological and non-immunological effects of cytokines and chemokines in the pathogenesis of chronic Chagas disease Cardiomyopathy. *Mem Inst Oswaldo Cruz*. 2009; Vol. 104(Suppl. I): 252-258.

Delgado-Veja AM, Martin J, Granados J, Anaya JM. Epidemiología genética de La artritis reumatóide: ¿qué esperar de America latina?. *Biomédica*. 2006; 26: 562-84.

Dutra WO, Gollob KJ. Current concepts in immunoregulation and pathology of human Chagas disease. *Current Opinion in Infectious Diseases* 2008, 21:287–292 2009.

Dutra WO, Menezes CA, Villani FN. et al. Cellular and genetic mechanisms involved in the generation of protective and pathogenic immune responses in human Chagas disease. *Mem Inst Oswaldo Cruz*, Rio de Janeiro.2009; 104(Suppl. I):208-218.

Fernández-Mestre, M.T., S. Montagnani, and Z. Layrisse, Is the CCR5-59029-G/G Genotype a Protective Factor for Cardiomyopathy in Chagas Disease? *Hum Immunol*, 2004. 65: p. 725-728.

Ferreira RC, et al. Increased plasma levels of tumor necrosis factor-alpha in asymptomatic/"indeterminate" and Chagas disease cardiomyopathy patients. *Mem Inst Oswaldo Cruz* Apr, 2003, vol. 98, no. 3, p. 407-11.

Flórez O, et al. Interleukin-1 gene cluster polymorphism in chagas disease in a Colombian case-control study. *Hum Immunol* Sep, 2006, vol. 67, no. 9, p. 741-8.

Flórez O, Martín J, González CI. Genetic variants in the chemokines and chemokine receptor in Chagas disease. *Human Immunology*. 2012;73:852-858.

Franco-Paredes C, et al. Transplantation and tropical infectious diseases. *Int J Infect Dis*. 2010 Mar 14(3):189-96.

Franke A., et al. Genome-wide meta-analysis increases to 71 the number of confirmed Crohn's disease susceptibility loci. *Nature genetics* Dec, 2010, vol. 42, no. 12, p. 1118-25.

Frazer, K.A., et al. Human genetic variation and its contribution to complex traits. *Nat Rev Genet* Apr, 2009, vol. 10, n. 4, p.241-151.

Garg N, Popov VL, and Papaconstantinou J. Profiling gene transcription reveals a deficiency of mitochondrial oxidative phosphorylation in *Trypanosoma cruzi*-infected murine hearts: implications in chagasic myocarditis development. *Biochim Biophys Acta* Jul 14, 2003, vol. 1638, no. 2, p. 106-20.

Gazzinelli RT, and Denkers, EY. Protozoan encounters with Toll-like receptor signalling pathways: implications for host parasitism. *Nature reviews. Immunology* Dec, 2006, vol. 6, no. 12, p. 895-906.

Ghildardi G, et al. Genetic risk factor characterizes abdominal aortic aneurysm from arterial occlusive disease in human beings: CCR5 Delta 32 deletion. *J Vasc Surg*. 2004; 40:995–1000.

Gomes J, et al. Type I chemokine receptor expression in Chagas disease correlate with morbidity in cardiac patients. *Inf Immun* 2005. 73:7960-7966.

González CI, and Mantilla JC. Cardiomyopathies from basic research to clinical management. Chapter 34. Chagas heart disease. 21012. 749-767

Gonzalez P, et al. Genetic variation at the chemokine receptors CCR5-CCR2 in myocardial infarction. *Genes Immun*. 2001;2:191-5.

Guhl F, Aguilera G, Pinto N, Vergara D. Actualización de la distribución geográfica y ecoepidemiología de la fauna de triatominos (Reduviidae: Triatominae) en Colombia. 2007. EN: Biomédica 2007; 27(1):143-162.

Guhl F, et al. Silvatic triatominae: a new challenge in vector control transmission. Mem Inst Oswaldo Cruz. 2009 Jul;104 Suppl 1:71-5.

Guhl F, et al. Updated geographical distribution and ecoepidemiology of the triatomine fauna Reduviidae Triatominae in Colombia. Biomedica. 2007: Jan 27 Suppl 1:143-62.

Guhl F. Estado actual del control de la enfermedad de Chagas en Colombia. EN: Medicina Buenos Aires. 1999; 59: 103-116.

Gutierrez R, et al. Comparison of four serological tests for the diagnosis of Chagas disease in a Colombian endemic area. En: Parasitology Vol. 129 (2004); p. 439 - 444.

Hall IP, et al. Association of CCR5 delta32 with reduced risk of asthma. Lancet 1999; 354:1264–5.

Hernandez-Leiva E, et al. Epidemiología del síndrome coronario agudo y la insuficiencia cardiaca en Latinoamérica. Esp Cardiol. 2011;64:34-43.

Hindorff LA, 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, n. 23, p.9362- 9367.

Hirschhorn, et al. A comprehensive review of genetic association studies. Genet Med. 2002;4(2):45-61.

Hladik F, et al. Combined effect of CCR5-Delta32 heterozygosity and the CCR5 promoter polymorphism -2459 A/G on CCR5 expression and resistance to human immunodeficiency virus 1 transmission. J Virol. 2005; 79:11677–84.

Hughes T, et al. Fine-mapping and transethnic genotyping establish IL2/IL21 genetic association with lupus and localize this genetic effect to IL21. Arthritis and rheumatism Jun, 2011, vol. 63, no. 6, p. 1689-97.

Huizinga TW, Pisetsky DS, Kimberly RP. Association, population and the truth: recommendations for genetic association studies in Arthritis & Rheumatism. Arthritis Rheum 2004, 50:2066-2071.

Iniesta R, Guiño E, Moreno V. Análisis estadístico de polimorfismos genéticos en estudios epidemiológicos. Gaceta Sanitaria. Barcelona, 2005, Julio–Agosto. v.19 n.4.

Jakkula E, et al. Genome-wide association study in a high-risk isolate for multiple sclerosis reveals associated variants in STAT3 gene. American journal of human genetics Feb 12, 2010, vol. 86, no. 2, p. 285-91.

Jhang WK, et al. The CCR5 (-2135 C/T) polymorphism may be associated with the development of Kawasaki disease. J Clin Immunol. 2009. 29:22-28.

Kalev I, et al. CC-chemokine receptor CCR5-del32 mutation as a modifying pathogenetic factor in type I diabetes. Diabetes Complications. 2003;17:387-91.

Kantarci OH, et al. CCR5Delta32 polymorphism effects on CCR5 expression, patterns of immunopathology and disease course in multiple sclerosis. J Neuroimmunol. 2005; 169:137–43.

Kayama H, et al. The innate response to Trypanosoma cruzi infection. Microbes and Infection. 12 (2010) 511-517.

Kroll-Palhares K, Coutinho J, Da Silva A.A, Michailowsky V. TNF/TNFR1 signaling up-regulates CCR5 expression by CD8+ T lymphocytes and promotes heart tissue damage during Trypanosoma cruzi infection: beneficial effects of TNF- α blockade. Mem Inst Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro, June 2008. Vol. 103(4): 375-385.

Lima MF, et al. Beta-chemokines that inhibit HIV-1 infection of human macrophages stimulate uptake and promote destruction of Trypanosoma cruzi by human macrophages. Cell Mol Biol. 1997 Nov; 43 (7): 1067-76.

Loeffler J, et al. Polymorphisms in the genes encoding chemokine receptor 5, IL10, and monocyte chemoattractant Protein 1 contribute to Cytomegalovirus reactivation and disease after allogeneic stem cell transplantation. Clinical Microbiology, May 2006, p, 1847-1850.

Machado F, et al. Current understanding of immunity to Trypanosoma cruzi infection and pathogenesis of Chagas disease. Semin Immunopathol. 2012. 281(012)351-357.

Maho A, Bensimon A, Vassart G, Parmentier M. Mapping of the CCXCR1, CX3CR1, CCBP2 and CCR9 genes to the CCR cluster within the 3p21.3 region of the human genome. Cytogenet Cell Genet 1999;87:265-268

Manque PA, et al. Trypanosoma cruzi infection induces a global host cell response in cardiomyocytes. Infect Immun. 2011 May; 79 (5): 1855-62.

Marino AP, et al. CC-chemokine receptors: a potential therapeutic target for Trypanosoma cruzi elicited myocarditis. Mem Inst Oswaldo Cruz. 2005 Mar;100 Suppl 1:93-6.

Martin MP, et al. Genetic acceleration of AIDS progression by a promoter variant of CCR5. Science. 1998; 282: 1907-11.

Maya JD, et al. Chagas disease: Present status of pathogenic mechanisms and chemotherapy. Biol Res. 2010;43(3):323-31.

McDermott DH, Zimmerman PA, Guignard F, Kleeberger CA, Leitman SF, Murphy PM. CCR5 promoter polymorphism and HIV-1 disease progression. Multicenter AIDS Cohort Study (MACS). Lancet. 1998;352:866–870.

Medeiros GA, et al. Treatment of chronically Trypanosoma cruzi-infected mice with a CCR1/CCR5 antagonist (Met-RANTES) results in amelioration of cardiac tissue damage. Microbes Infect. 2009 Feb; 11 (2): 264-73.

Miller S.A, Dykes D.D, Poesky H.F. A simple salting out procedure for extracting DNA from human nucleated cells. Nucleic Acid Research. Minneapolis, USA.1998. Volume 16 Number 3.

Mitchell TJ, et al. Delta 32 deletion of CCR5 gene and association with asthma or atopy. Lancet. 2000; 356:1491–2.

Mlynarski WM, et al. Risk of diabetic nephropathy in type 1 diabetes is associated with functional polymorphisms in RANTES receptor gene (CCR5): a sex-specific effect. Diabetes. 2005 Nov; 54(11):3331-5.

Moncayo A, Silveira A. Current epidemiological trends for Chagas disease in Latin America and future challenges in epidemiology, surveillance and health policy. Mem Ins Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro, 2009, Vol. 104 (Suppl.I): 17-30.

Moncayo A. Chagas' disease: current epidemiological trends after the interruption of vectorial and transfusional transmission in the Southern Cone countries. Mem Inst Oswaldo Cruz. 2003; 98(5):577-591.

Mosca W, et al. Inmunología e inmunopatología. Libro: Inmunología e inmunopatología de la enfermedad de Chagas. Facultad de medicina Universidad Central de Venezuela. 2007. Capítulo III.

Mukherjee S, et al. Alterations in myocardial gene expression associated with experimental *Trypanosoma cruzi* infection. *Genomics* May, 2008, vol. 91, no. 5, p. 423-32.

Mummidi S, et al. Evolution of Human and Non-human Primate CC chemokine receptor 5 gene and mRNA. *Jurnal of Biological Chemistry*. 2000 Jun: 23 (25): 18946-18961.

Nieto A, Beraún Y, Collado MD, Caballero A, Alonso A, González A, Martín J. HLA haplotypes are associated with differential susceptibility to *Trypanosoma cruzi* infection. *Tissue Antigens*. 2000; 55(3):195-198.

O'Brien SJ, et al. The effect of genetic variation in chemokines and their receptors on HIV transmission and progression to AIDS. *Immunol Rev*. 2000; 177:99–111.

Onuffer JJ, Horuk R. Chemokines, chemokine receptors and small-molecule antagonists: recent developments. *EN: Trends Pharmacol Sci*. 2002. Oct;23 (10): 459-67.

Oppermann M. Chemokine receptor CCR5: insights into structure, function, and regulation. *EN: Cell Signal*. 2004. Nov; 16 (11): 1201-10.

OPS. Organización Panamericana de la Salud. Estimación cuantitativa de la Enfermedad de Chagas en las Américas. In Buenos Aires, 2006. Argentina. 17-20.

Palmer LJ, and Cardon LR. Shaking the tree: mapping complex disease genes with linkage disequilibrium. *Lancet* Oct 1, 2005, vol. 366, n. 9492, p.1223-1234.

Petrek M, et al. CC chemokine receptor gene polymorphisms in Czech patients with pulmonary sarcoidosis. *Am J Respir Crit Care Med*. 2000; 162:1000–3.

Pokomy V, et al. Evidence for negative association of the chemokine receptor CCR5 d32 polymorphism with rheumatoid arthritis. *Ann Rheum Dis*. 2005, 64:487–90.

Purcell S, et al. PLINK: a tool set for whole-genome association and population-based linkage analyses. *American Journal of Human Genetics* Sep, 2007, vol. 81, no. 3, p. 559-75.

Ramasawmy R, et al. BAT1, a putative anti-inflammatory gene, is associated with chronic Chagas cardiomyopathy. *En: J Infect Dis*. 2006; 193: 1394-99.

Ramasawmy R, et al. Polymorphisms in the gene for limphotoxin-a predispose to chronic Chagas cardiomyopathy. J Infect Dis, 2007; 196: 1836-43.

Ramasawmy R, Fae KC, Cunha-Neto E, Borba SC, Ianni B, Mady C, Goldberg AC, Kalil J. Variants in the promoter region of *IKBL/NFKBIL1* gene may mark susceptibility to the development of chronic Chagas' cardiomyopathy among *Trypanosoma cruzi*-infected individuals. Mol Immunol.2008 ; 45(1):283-8.

Rassi A Jr, Rassi A, Marin-Neto JA. Chagas disease. Lancet. 2010;17;375 (9723):1388-402.

Ribeiro M, et al. Chagasic patients develop a type 1 immune response to *Trypanosoma cruzi* trans-sialidase. Parasite Immunol Jan, 2000, vol. 22, no. 1, p. 49-53.

Rocha MO, Teixeira MM, Ribeiro AL. An update on the management of Chagas cardiomyopathy. Expert Rev Anti Infect Ther. 2007; 5: 727-743.

Rodrigues CM, Valadares HMS, Francisco AF, Arantes JM, Campos CF. Coinfection with Different *Trypanosoma cruzi* Strains Interferes with the Host Immune Response to Infection. PLoS Negl Trop Dis 4 (2010): e846. doi:10.137

Sakuntabhai A., et al. Genetic determination and linkage mapping of *Plasmodium falciparum* malaria related traits in Senegal. PLoS One 2008, vol. 3, no. 4, p.2000.

Salkowitz, J.R., Bruse, S.E., Meyerson, H., Valdez, H., Mosier, D.E., Harding, C.V., Zimmerman, P.A., Lederman, M.M., 2003. CCR5 promoter polymorphism determines macrophage CCR5 density and magnitude of HIV-1 propagation in vitro. Clin. Immunol. 108, 234–240.

Samson M, Soularue P, Vassart G, Parmentier M: The genes encoding the human CC-chemokine receptors CC-CCR1 to CC-CCR5 (CMKBR1-CMKBR5) are clustered in the 3p21.3→p24 region of chromosome 3. Genomics 36:522–526.

Sandford AJ, et al. The role of the C-C chemokine receptor-5 Delta32 polymorphism in asthma and in the production of regulated on activation, normal T cells expressed and secreted. J Allergy Clin Immunol. 2001; 108:69– 73.

Sandoval C, Gutierrez R, Luna S, Amaya M, Esteban L. High density of *Rhodnius prolixus* in a rural house in Colombia. Transactions of the royal society of tropical medicine and hygiene. 2000, 94,372-373.

Savino W, et al. Cytokines and cell adhesion receptors in the regulation of immunity to *Trypanosoma cruzi*. Cytokine Growth Factor Rev Feb-Apr, 2007, vol. 18, no. 1-2, p. 107-24.

Schmunis GA. Epidemiology of Chagas disease in non-endemic countries: the role of international migration. Mem Inst Oswaldo Cruz Oct 30, 2007, vol. 102 Suppl 1, no., p. 75-85.

Sellebjerg F, et al. CCR5 delta32, matrix metalloproteinase-9 and disease activity in multiple sclerosis. J Neuroimmunol. 2000, 102:98-106.

Shieh B, Liao YE, Hsieh PS, Yan YP, Wang ST, Li C. Influence of nucleotide polymorphisms in the CCR2 gene and the CCR5 promoter on the expression of cell surface CCR5 and CXCR4. Int Immunol 2000;12:1311–1318.

Shiel B, et al. Influence of nucleotide polymorphisms in the CCR2 gene and the CCR5 promoter on the expression of cell surface CCR5 and CXCR4. Int Immunol. 2000: 12:1311-8.

Silva AA, Roffê E, Santiago H, Marino AP. *Trypanosoma cruzi*-triggered meningoencephalitis is a CCR1/CCR5-independent inflammatory process. J Neuroimmunol. 2007 Mar; 184(1-2):156-63.

Silversides JA, et al. Influence of CCR5 delta32 polymorphism on multiple sclerosis susceptibility and disease course. Mult Scler. 2004; 10:149–52.

Sosa-Estani S, Segura, et al. Etiological treatment in patients infected by *T. cruzi*: experiences in Argentina. Curr Opin Infect Dis. 2006; 19: 583-587.

Soto-Sánchez J, et al. Genetic variation at the CCR5/CCR2 gene cluster and risk of psoriasis and psoriatic arthritis. Cytokine. 2010. 50: 114-116.

Souza PE, et al. Monocytes from patients with indeterminate and cardiac forms of Chagas' disease display distinct phenotypic and functional characteristics associated with morbidity. Infect Immun Sep, 2004, vol. 72, no. 9, p. 5283-91.

SSS. Secretaría de Salud de Santander. Enfermedades de transmisión vectorial. Sivigila 2007

SSS. Secretaria de Salud de Santander. Los bancos de sangre en la vigilancia en salud pública de enfermedades transmitidas por la sangre. Sivigila 2001.

Stahl EA, et al. Genome-wide association study meta-analysis identifies seven new rheumatoid arthritis risk loci. *Nature genetics* Jun, 2010, vol. 42, no. 6, p. 508-14.

Strieter RM, Belperio JA et al. Cytokines in innate host defence in the lung. *Clin invest.* 2002; 109: 699-705.

Talvani A, et al. Chemokine receptor expression on the surface of peripheral blood mononuclear cells in Chagas disease. *The Journal of infectious diseases* Jan 15, 2004, vol. 189, no. 2, p. 214-20.

Talvani A, et al. Cyclic AMP decreases the production of NO and CCL2 by macrophages stimulated with *Trypanosoma cruzi* GPI-mucins. *Parasitol Res* Apr, 2009, vol. 104, no. 5, p. 1141-8.

Talvani A, Rocha M.O, Barcelos L.S, Gomes Y.M, Ribeiro A.L, Teixeira M.M. Elevated concentrations of CCL2 and tumor necrosis factor-alpha in chagasic cardiomyopathy, *Clin.Infect.Dis.* 38 (2004) 943-950.

TaqMan SNP Genotyping Assay. Applied Biosystems. 2010.

Tarlenton RL. Immune system recognition of *Trypanosoma cruzi*. *Curr Opin Immunol* Aug, 2007, vol. 19, no. 4, p. 430-4.

Thompson D, et al. Haplotype tagging single nucleotide polymorphisms and association studies. *Human heredity* 2003, vol. 56, n.1-3, p.48-55.

Torres O, Calzada J, et al. Association of the macrophage migration inhibitor factor 173G7C polymorphism with Chagas disease. *Hum Immunol.* 2009 July; 70(7), 543-546.

Torres O, Calzada JE, Beraun Y, et al. Role of the IFN + 874T/A polymorphism in Chagas disease in a Colombian population. *Infect Genet evol.* 2010 Mar 30.

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. *Rev Soc Bras Med Trop* 2005, vol. 38 Suppl 2, no., p. 17-20.

Turner, J.E., et al., Targeting of Th1-Associated Chemokine Receptors CXCR3 and CCR5 as Therapeutic Strategy for Inflammatory Diseases. *Hum Immunol*, 2007. 65(7): p. 725-728.

Villalta F, et al. The cysteine-cysteine family of chemokines RANTES, MIP-1 alpha, and MIP-1beta induce trypanocidal activity in human macrophages via nitric oxide. *Infect Immun*. 1998 Oct; 66 (10): 4690-5.

Vitelli-Avelar DM, et al. Chagas patients with indeterminate clinical form of the disease have high frequencies of circulating DC3 CD16-CD56 natural killer T cells and CD4 CD25 high regulatory T lymphocytes. *Scand J Immunol*. 2005, 62 (3):297-308.

Vitelli-Avelar DM, et al. Non-conventional flow cytometry approaches to detect anti-Trypanosoma cruzi immunoglobulin G in the clinical laboratory. *J Immunol Methods* Jan 10, 2007, vol. 318, no. 1-2, p. 102-12.

Wang FS, Hong WG, Cao Y, Liu MX, Jin L, Hu LP et al. Population survey of CCR5 delta32, CCR5 m303, CCR2b 64I, and SDF1 3'A allele frequencies in indigenous Chinese healthy individuals, and in HIV-1-infected and HIV-1-uninfected individuals in HIV-1 risk groups. *J Acquir Immune Defic Syndr*. 2003; 32:124-30.

WOH. World Health Organization. Informe de la Organización Mundial de la salud. Mayo 2010.

WOH. World Health Organization. Document EB 124-17, January 2009. Available from: www.who.int

WOH-TDR. World Health Organization. Reporte sobre la Enfermedad de Chagas. Abril 2005, Buenos Aires - Argentina. Actualizado Julio 2007.

Woitas RP, et al. Frequency of the HIV-protective CC CC chemokine receptor 5 $\Delta 32/\Delta 32$ genotype is increased in hepatitis C. *Gastroenterology* 2002; 122:1721-28.

Wong MM, et al. Chemokines: attractive mediators of the immune response. *Seminars in immunology*. 2003;15,5-14.

Yacoub S, et al. Disease appearance and evolution against a background of climate change and reduced resources. *The Royal Society*. 2011.369, 1719-1729.

Zafra G, et al. Polymorphism in the 3' UTR of the IL12B gene is associated with Chagas' disease cardiomyopathy. *Microbes Infect* Jul, 2007, vol. 9, no. 9, p. 1049-52.

ANEXO

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