

Asociación de los polimorfismos de un solo nucleótido de los genes *ANKRD1* y *MAP4K4* con el desarrollo o gravedad de la cardiomiopatía chagásica crónica.

Elkyn Fabián Estupiñán Moreno

Trabajo de grado presentado para optar al título de Magister en Microbiología

Directora

Clara Isabel González Rugeles

PhD. en Inmunogenética

Universidad Industrial de Santander

Facultad de Salud

Escuela de Microbiología

Maestría en Microbiología

Bucaramanga

2019

Contenido

	Pág.
Introducción	12
1. Enfermedad de Chagas	14
1.1 Agente etiológico de la enfermedad de Chagas	15
1.2 Vectores y reservorios de <i>Trypanosoma cruzi</i>	17
1.3 Epidemiología	18
1.4 Aspectos clínicos de la enfermedad de Chagas	24
1.5 Diagnóstico de la enfermedad	30
1.6 Tratamiento	32
2. Patogénesis de la enfermedad de Chagas	34
2.1 Respuesta inmune en la enfermedad de Chagas	35
3. Estudios de Asociación	45
3.1 Susceptibilidad genética a las enfermedades infecciosas	48
3.2 Susceptibilidad genética a la enfermedad de Chagas	53
4. Gen <i>ANKRD1</i>	60
5. Gen <i>MAP4K4</i>	69
6. Justificación	73
7. Objetivos	75
7.1 Objetivo General	75

7.2 Objetivos Específicos.....	76
8. Materiales y Métodos.....	76
8.1 Población del estudio	76
8.2 Selección de genes para el presente estudio	77
8.3 Selección de polimorfismos.....	78
8.4 Genotipificación e imputación de los polimorfismos	78
8.5 Análisis estadístico.....	81
8.6 Consideraciones Éticas	82
9. Resultados	83
9.1 Análisis de la población.....	83
9.2 Análisis de asociación alélica y genotípica.....	85
9.3 Análisis de Haplotipos	89
9.4 Poder estadístico del estudio.....	90
10. Discusión.....	91
11. Conclusiones	100
12. Recomendaciones	101
Referencias Bibliográficas	102

Lista de Figuras

	Pág.
<i>Figura 1.</i> Estadios morfológicos de <i>Trypanosoma cruzi</i> . (A) Tripomastigotes metacíclicos. (B) Amastigotes en tejido cardíaco. (C) Tripomastigote sanguíneo en extendido de sangre periférica. (D) Epimastigote de cultivo.....	16
<i>Figura 2.</i> Ciclo de vida de <i>Trypanosoma cruzi</i>	17
<i>Figura 3.</i> Distribución global de individuos infectados con <i>Trypanosoma cruzi</i>	20
<i>Figura 4.</i> Distribución geográfica de la prevalencia de infección con <i>Trypanosoma cruzi</i> en Colombia.....	21
<i>Figura 5.</i> Prevalencia de la enfermedad de Chagas en el departamento de Santander.	21
<i>Figura 6.</i> Curso natural de la infección humana con <i>T. cruzi</i>	25
<i>Figura 7.</i> Trastornos mecánicos y eléctricos comúnmente observados en la cardiomiopatía chagásica crónica. PVCs, contracciones ventriculares prematuras; RBBB, bloqueo de rama derecha; VT, taticardia ventricular.	28
<i>Figura 8.</i> Diferencias en la respuesta inmune de pacientes en fase indeterminada y pacientes con CCC.....	37
<i>Figura 9.</i> Localización y estructura del gen <i>ANKRD1</i>	61
<i>Figura 10.</i> Mapa de desequilibrio de ligamiento del gen <i>ANKRD1</i>	62
<i>Figura 11.</i> Funciones patológicas de la proteína ANKR1.....	66
<i>Figura 12.</i> Localización y estructura del gen <i>MAP4K4</i>	69

<i>Figura 13.</i> Mapa de desequilibrio de ligamiento del gen <i>MAP4K4</i> . T.....	70
<i>Figura 14.</i> Interacciones de la proteína M4K4.	71
<i>Figura 15.</i> Ensayo de genotipificación.	80

Lista de Tablas

	Pág.
Tabla 1. <i>Clasificación de la enfermedad de Chagas</i>	28
Tabla 2. <i>Genes identificados en enfermedades infecciosas, agrupados de acuerdo con fenotipos y poblaciones estudiadas</i>	50
Tabla 3. <i>Genes del MHC asociados o no a infección y/o formas crónicas sintomáticas de la ECh en distintas poblaciones endémicas de Latinoamérica. CCC, cardiomiopatía chagásica crónica.</i>	55
Tabla 4. <i>Genes de citoquinas, quimioquinas y sus receptores asociados o no a infección y/o formas crónicas sintomáticas de la ECh en distintas poblaciones endémicas de Latinoamérica. CCC, cardiomiopatía chagásica crónica</i>	57
Tabla 5. <i>Otros genes asociados o no a infección y/o formas crónicas sintomáticas de la ECh en distintas poblaciones endémicas de Latinoamérica. CCC, cardiomiopatía chagásica crónica.</i>	58
Tabla 6. <i>Interacciones de la proteína ANKR1</i>	62
Tabla 7. <i>Características demográficas y clínicas de la población en estudio</i>	84
Tabla 8. <i>Análisis de frecuencias alélicas de SNPs en los genes ANKRD1 y MAP4K4 estadísticamente significativos en la población estudiada</i>	86
Tabla 9. <i>Análisis de frecuencias genotípicas de SNPs en los genes ANKRD1 y MAP4K4 estadísticamente significativos en la población estudiada</i>	87

Tabla 10. <i>Análisis de haplotipos del gen ANKRD1</i>	90
Tabla 11. <i>Cálculo del poder estadístico considerando diferentes tamaños de efecto</i>	91

Resumen

TÍTULO: ASOCIACIÓN DE LOS POLIMORFISMOS DE UN SOLO NUCLEÓTIDO DE LOS GENES *ANKRD1* Y *MAP4K4* CON EL DESARROLLO O GRAVEDAD DE LA CARDIOMIOPATÍA CHAGÁSICA CRÓNICA *

AUTOR: ELKYN FABIÁN ESTUPIÑÁN MORENO**

PALABRAS CLAVES: GEN *ANKRD1*, GEN *MAP4K4*, POLIMORFISMO DE UN SOLO NUCLEOTIDO (SNP), CARDIOMIOPATÍA CHAGÁSICA CRÓNICA (CCC), ENFERMEDAD DE CHAGAS (ECh).

DESCRIPCIÓN

La enfermedad de Chagas (ECh) es causada por la infección con el parásito *Trypanosoma cruzi*. Los mecanismos involucrados en la susceptibilidad y/o desarrollo de las formas crónicas de la enfermedad no están totalmente definidos. Sin embargo, existe una creciente evidencia donde el componente genético del hospedero juega un papel diferencial importante. El objetivo de este trabajo fue establecer la asociación de los polimorfismos de un solo nucleótido de los genes *ANKRD1* y *MAP4K4* y sus haplotipos con el desarrollo o gravedad de la cardiomiopatía chagásica crónica en pacientes infectados con *Trypanosoma cruzi*. Estudio de casos y controles realizado en 1499 individuos clasificados como seronegativos (n=592), seropositivos (n=907), asintomáticos (n = 365) y pacientes con CCC (n = 542). La genotipificación de las muestras se realizó en la micro-matriz Global Screening Array y la imputación de los datos se realizó en el servidor Michigan Imputation. Los datos se analizaron con el software PLINK. Este trabajo evidenció que 5 SNPs del gen *ANKRD1* y 3 SPNs del gen *MAP4K4* ubicados en regiones intrónicas, están asociados con la ECh en una población colombiana. Los rs10047267, rs11595794 y rs10881853 del gen *ANKRD1* mostraron asociación con protección a la infección, mientras que los rs2236935 y rs13400697 del gen *MAP4K4* se asociaron con riesgo a la infección. Por otra parte, los rs17102362 y rs11186367 del gen *ANKRD1* y el rs2072206 del gen *MAP4K4* estuvieron asociados con el desarrollo de CCC. Para poder determinar el papel de los polimorfismos encontrados en nuestro estudio, se hace necesario adelantar estudios funcionales que permitan determinar si éstos regulan o no la expresión de estos genes o participan en la estabilidad de su ARNm. Realizar estudios de replicación en otras poblaciones endémicas de la ECh confirmaría las asociaciones encontradas en nuestro estudio.

* Trabajo de grado

** Facultad de Salud. Escuela de Microbiología. Maestría en Microbiología Directora: Clara Isabel González Rugeles

Abstract

TITLE: ASSOCIATION OF SINGLE NUCLEOTIDE POLYMORPHISM OF THE *ANKRD1* AND *MAP4K4* GENES WITH THE DEVELOPMENT OR GRAVITY OF CHRONIC CHAGASIC CARDIOMYOPATHY*

AUTHOR: ELKYN FABIÁN ESTUPIÑÁN MORENO**

KEY WORDS: *ANKRD1* GENE, *MAP4K4* GENE, SINGLE NUCLEOTIDE POLYMORPHISM (SNP), CHRONIC CHAGASIC CARDIOMYOPATHY (CCC), CHAGAS DISEASE (ChD).

DESCRIPTION

Chagas disease (ChD) is caused by infection with the *Trypanosoma cruzi* parasite. The mechanisms involved in the susceptibility and / or development of chronic forms of the disease are not fully defined. However, there is growing evidence where the host's genetic component plays an important differential role. The objective of this work was to establish the association of single nucleotide polymorphisms of the *ANKRD1* and *MAP4K4* genes and their haplotypes with the development or severity of chronic chagasic cardiomyopathy in patients infected with *Trypanosoma cruzi*. Case-control study conducted in 1499 individuals classified as seronegative (n = 592), seropositive (n = 907), asymptomatic (n = 365) and patients with CCC (n = 542). The genotyping of the samples was carried out in the micro-matrix Global Screening Array and the imputation of the data was done in the Michigan Imputation Server. The data was analyzed with the PLINK software. This work showed that 5 SNPs of the *ANKRD1* gene and 3 SNPs of the *MAP4K4* gene located in intronic regions, are associated with the ChD in a colombian population. The rs10047267, rs11595794 and rs10881853 of the *ANKRD1* gene showed an association with infection protection, while the rs2236935 and rs13400697 of the *MAP4K4* gene were associated with risk of infection. On the other hand, rs17102362 and rs11186367 of the *ANKRD1* gene and rs2072206 of the *MAP4K4* gene were associated with the development of CCC. In order to determine the role of polymorphisms found in our study, it is necessary to carry out functional studies to determine whether they regulate the expression of these genes or participate in the stability of their mRNA. Performing replication studies in other endemic populations of the ChD would confirm the associations found in our study.

* Master thesis

** Facultad de salud. Escuela de Microbiología. Maestría en Microbiología Directora: Clara Isabel González Rugeles

Introducción

La enfermedad de Chagas (ECh) o tripanosomiasis americana es causada por la infección con el protozoo flagelado *Trypanosoma cruzi*, este parásito es transmitido principalmente por insectos de la subfamilia *Triatominae* (Rassi *et al.*, 2010; Rassi *et al.*, 2012; Bonney *et al.*, 2017). La ECh afecta especialmente a las poblaciones más pobres y vulnerables del área rural de 21 países de América Latina donde se considera un problema de salud pública. Según reportes de la Organización Mundial de la Salud (OMS) se estima que alrededor de 6 a 7 millones de personas a nivel mundial están infectadas, 10.000 muertes se producen anualmente por esta enfermedad y aproximadamente 90 millones de personas se encuentran en riesgo de adquirir la infección (WHO, 2019). Por otra parte, debido al elevado flujo migratorio de personas infectadas con *T. cruzi* desde países endémicos de la enfermedad, se han reportado nuevos casos de ECh en países no endémicos (España, Australia, Japón y USA) (Rassi *et al.*, 2012). En Colombia, se estima que hay 437.960 personas infectadas con *T. cruzi* y menos del 1% de estos sujetos tienen acceso a diagnóstico y tratamiento adecuado (Cucunubá *et al.*, 2017).

La ECh presenta una fase aguda inicial con parasitemia marcada y una fase crónica, la cual se clasifica en asintomática o sintomática con formas cardíacas y digestivas. La forma cardíaca es la manifestación más frecuente de la fase crónica en nuestro país y se presenta como una cardiomiopatía chagásica crónica (CCC), la cual se desarrolla décadas después de la infección, con peor pronóstico y mayor mortalidad que otras cardiomiopatías (Rassi *et al.*, 2010; Bonney *et al.*, 2017). Dada la relevancia del componente inflamatorio y la respuesta inmune en la

fisiopatogénesis de la CCC y el hecho de que menos del 30% de pacientes seropositivos presentan alteraciones cardíacas en algún momento de su vida, el componente genético del hospedero se considera un factor relevante de numerosos estudios (Frade *et al.*, 2013).

Dentro del genoma humano, las variantes más frecuentes y estudiadas son los polimorfismos de un solo nucleótido (SNPs, por sus siglas en inglés), éstos han permitido explicar la susceptibilidad o resistencia a desarrollar diversas enfermedades crónicas o infecciosas (Kwok, 2003). En cuanto a la ECh, polimorfismos en genes del complejo mayor de histocompatibilidad, citoquinas, quimioquinas, canales iónicos y genes codificantes de proteínas del citoesqueleto se han asociado o no con la susceptibilidad a la infección y al desarrollo y/o progresión de la CCC (Vasconcelos *et al.*, 2012; Ayo *et al.*, 2013; Shaw, 2017; Acosta-Herrera *et al.*, 2019).

Estudios de expresión génica realizados por el Grupo de Inmunología y Epidemiología Molecular (GIEM) permitieron identificar genes candidatos implicados en el desarrollo de la ECh (datos no publicados). Por esto, el presente trabajo seleccionó los genes *ANKRD1* y *MAP4K4*, cuya expresión en pacientes sintomáticos para la CCC fue significativa, además de estar involucrados en diferentes vías importantes en la patogénesis de la ECh.

El gen *ANKRD1* codifica para la proteína de dominio 1 de repetición de anquirina (Ankiryn repeat domain containing protein 1, UniProtKB-Q15327 (ANKR1_HUMAN)), también conocida como proteína de repetición de anquirina cardíaca (CARP). Esta proteína, tiene funciones pleiotrópicas ya que desempeña roles fundamentales en la regulación transcripcional, el ensamblaje del sarcómero y en el sistema mecano-receptor del corazón. Ha sido estudiada en procesos donde la hipertrofia, la fibrosis y una alta respuesta apoptótica se ven involucrados (Ling *et al.*, 2017). Por otra parte, el gen *MAP4K4*, codifica para la proteína quinasa quinasa quinasa 4 activada por mitógenos (Mitogen-activated protein kinase kinase kinase 4,

UniprotKB-O95819 (M4K4_HUMAN)), también conocida como quinasa progenitora hematopoyética (HGC). Esta proteína, juega un papel importante en la regulación de la respuesta inmune ya que puede inhibir la producción de $\text{TNF-}\alpha$, $\text{INF-}\gamma$, $\text{IL-1}\beta$, IL-6 y la activación de las demás proteínas quinasas inducidas por mitógenos involucradas en una amplia gama de procesos fisiológicos que incluyen la migración, proliferación y muerte celular, además, su actividad se ha implicado en inflamación sistémica, trastornos metabólicos, enfermedades cardiovasculares y cáncer (Chuang *et al.*, 2016).

Dada la importancia de estos dos genes en la respuesta inmune-inflamatoria, en su participación en la patogénesis de diversas enfermedades cardíacas, contar con el genotipado de sus SNPs y el hecho de que no han sido estudiados en la enfermedad de Chagas, el objetivo de este trabajo fue determinar su asociación con el desarrollo o gravedad de la CCC.

1. Enfermedad de Chagas

La ECh o tripanosomiasis americana fue descrita en 1909 por el médico brasileiro Carlos Chagas. La ECh es un trastorno multisistémico que puede afectar los sistemas cardiovascular y digestivo. Es causada por la infección con *Trypanosoma cruzi*, un protozooario hemoflagelado que se transmite principalmente por las heces y orina de insectos hematófagos de la familia *Reduviidae* y la subfamilia *Triatominae* (Bern, 2015; Pérez-Molina y Molina, 2018; Echeverría y Morillo, 2019). Esta enfermedad, afecta la salud y bienestar de un gran número de seres humanos y está íntimamente relacionada con el desarrollo socioeconómico de la población, constituyendo una de

las enfermedades parasitarias más importantes de América Latina donde se considera un problema de salud pública (Rassi *et al.*, 2012).

1.1 Agente etiológico de la enfermedad de Chagas

Trypanosoma cruzi es un parásito protozoo, hemoflagelado que pertenece a la clase *Amastigophora*, orden *Kinetoplastida*, familia *Trypanosomatidae* y género *Trypanosoma*. La característica morfológica distintiva de este parásito es la presencia de una estructura prominente y paraflagelar conocida como cinetoplasto, una organela especializada que contiene ADN (Brener, 1973). Este parásito presenta cuatro formas morfológicas diferentes (Figura 1):

- Tripomastigote metacíclico: forma infectante no replicativa, caracterizada por poseer una forma elongada y flagelada. Esta forma se desarrolla en el intestino y recto del insecto vector, su cinetoplasto se ubica posterior al núcleo (Figura 1A).
- Amastigote: se localiza en el citoplasma de la célula hospedera donde se replica por fisión binaria, tiene forma ovalada y no posee flagelo (Figura 1B).
- Tripomastigote sanguíneo: luego de varias divisiones, los amastigotes se transforman en tripomastigotes con forma alargada y flagelada, rompen la célula y se liberan al torrente sanguíneo diseminándose a nuevas células (Figura 1C).
- Epimastigote: presenta forma alargada y móvil, cinetoplasto anterior al núcleo y el flagelo, es la forma replicativa del parásito en el intestino del insecto vector (Figura 1D) (Brener, 1973; Tyler y Engman, 2001; Díaz *et al.*, 2014).

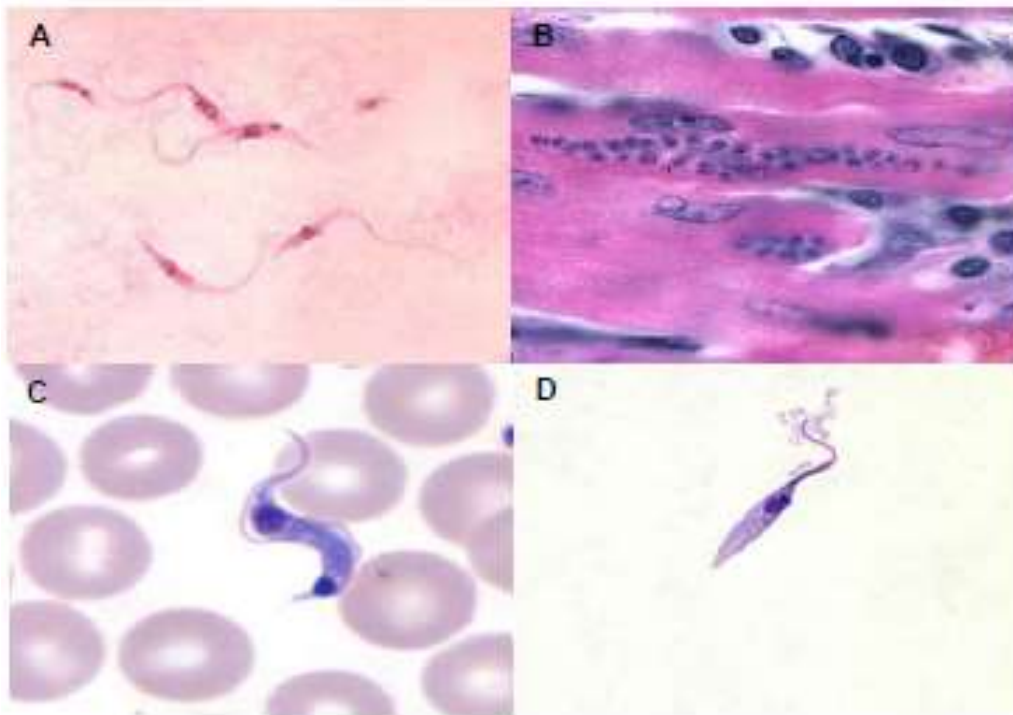


Figura 1. Estadios morfológicos de *Trypanosoma cruzi*. (A) Tripomastigotes metacíclicos. (B) Amastigotes en tejido cardíaco. (C) Tripomastigote sanguíneo en extendido de sangre periférica. (D) Epimastigote de cultivo. Nota. Tomado de: CDC (s.f.) Gallery Recuperado de: <https://www.cdc.gov/dpdx/trypanosomiasisAmerican/gallery.html>

1.1.1 Ciclo de vida de *Trypanosoma cruzi*. *Trypanosoma cruzi* presenta uno de los ciclos de vida más complejos ya que en este intervienen dos hospederos, un vertebrado mamífero y otro invertebrado o insecto triatomino comúnmente denominado pito o vinchuca. El ciclo de vida de *T. cruzi* inicia cuando el insecto se alimenta succionando sangre de reservorios mamíferos infectados que contienen tripomastigotes sanguíneos circulantes, de esta manera, los parásitos al llegar al estómago del insecto vector se transforman en epimastigotes, éstos migran hacia el intestino medio y grueso donde se multiplican para transformarse en tripomastigotes metacíclicos. En el hospedero vertebrado, el ciclo comienza cuando las formas metacíclicas son expulsadas en las heces y orina del insecto y son inoculadas en la piel o mucosas del vertebrado. Después de ingresar a la célula,

los tripomastigotes se transforman en amastigotes y se dividen por fisión binaria, después de varios procesos de división, se diferencian a tripomastigotes sanguíneos y se liberan al espacio intercelular invadiendo otras células y diseminándose por todo el torrente sanguíneo, llegando a múltiples tejidos diana y estableciendo una infección persistente (Figura 2). (Brener, 1973; Tyler y Engman, 2001; Bern, 2015; Lidani *et al.*, 2017; Pérez-Molina y Molina, 2018).

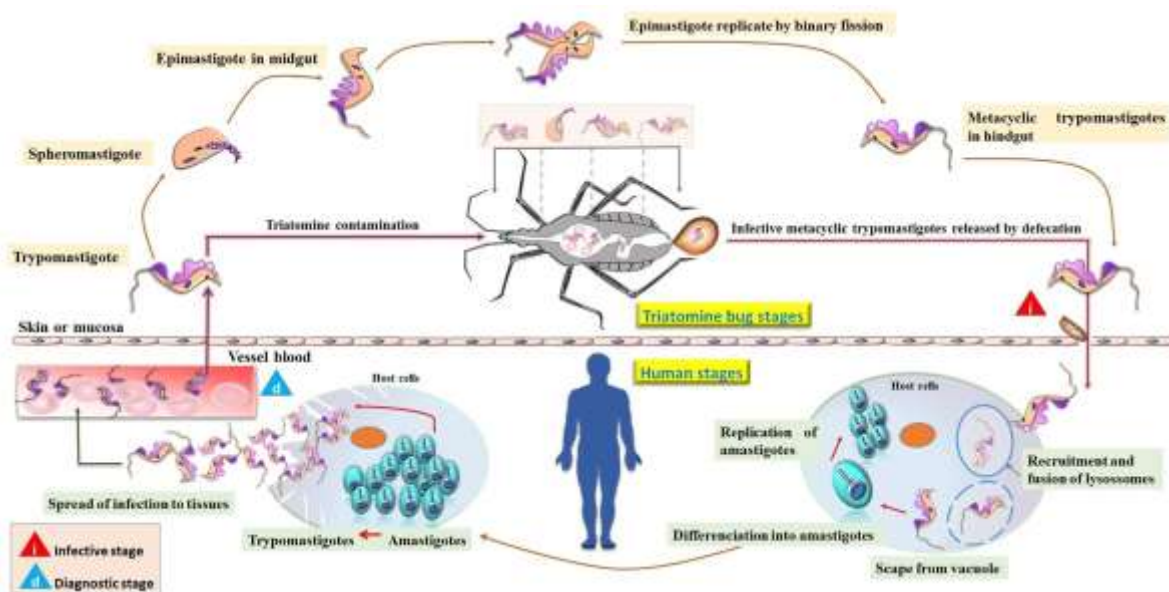


Figura 2. Ciclo de vida de *Trypanosoma cruzi*. Tomado de: Lidani *et al.*, 2017.

1.2 Vectores y reservorios de *Trypanosoma cruzi*

Los insectos triatóminos pertenecientes al orden *Hemiptera*, familia *Reduviidae*, y a la subfamilia *Triatominae*, son un grupo formado por cerca de 140 especies, muchas de las cuales son vectores de la ECh. Varios de estos insectos han colonizado las viviendas humanas por lo que transmiten *T. cruzi* a los seres humanos. Los triatóminos de mayor importancia epidemiológica en Latinoamérica

pertenecen a las especies *Triatoma infestans*, *Triatoma dimidiata*, *Rhodnius prolixus*, *Pastrongylus geniculatus*, *Triatoma brasiliensis* y *Pastrongylus megistus* (Lazzari *et al.*, 2013).

Se ha reportado que alrededor de 100 especies de mamíferos son reservorios naturales de *T. cruzi* y se considera que todos los mamíferos son susceptibles a la infección. La importancia epidemiológica de los reservorios varía de acuerdo con la región geográfica, debido a la biología y ecología de los mamíferos y vectores, dado que su interacción implica el riesgo de infección humana (Bern *et al.*, 2011). En América Latina, mamíferos pertenecientes a los géneros *Didelphis* (zarigüeya), *Dasybus* (armadillo) y roedores son los reservorios más predominantes y antiguos de *T. cruzi* (Noireau *et al.*, 2009). Por otra parte, los animales domésticos (perros y gatos) son reservorios importantes y pueden ser usados como centinelas para localizar la transmisión (Bern *et al.*, 2011), se ha descrito que las aves poseen resistencia a la infección de este parásito debido a que lo eliminan por lisis mediada por el complemento (Kierszenbaum *et al.*, 1981).

1.3 Epidemiología

La ECh es endémica en 21 países de América Latina, la OMS estima que de 6 a 7 millones de personas están infectadas en todo el mundo, 10.000 muertes se producen anualmente por esta enfermedad y aproximadamente 90 millones de personas se encuentran en riesgo de adquirir la infección (WHO, 2019).

Se han descrito cinco periodos epidemiológicos para la ECh los cuales pueden explicar su elevada prevalencia. Durante el período pre-homínido el parásito se mantuvo circulante en animales silvestres, cuando el hombre colonizó el continente americano se inició el segundo período en el cual se presentaron las primeras infecciones accidentales hace aproximadamente

26.000 años. Con el desarrollo de la agricultura se inicia un tercer período, en este, la deforestación causada por el ser humano conllevó al transporte de vectores, favoreciendo la generación de focos antrozo-zoonóticos para la enfermedad. Durante el siglo XX, con la implementación de iniciativas de control para disminuir la propagación de la enfermedad se desarrolló el cuarto período, en éste se dio un flujo aumentado de la población de zonas rurales endémicas a zonas urbanas no endémicas para la enfermedad. Finalmente, en el quinto período esta enfermedad se consideró un problema de salud pública a nivel mundial, caracterizándose por su alta morbilidad, mortalidad y con disponibilidad limitada de recursos para su diagnóstico, tratamiento y control (WHO, 2015).

En los últimos años la epidemiología de esta enfermedad ha tenido diversos cambios debido al impacto del cambio climático y los fenómenos de migración. Reportes recientes indican que Estados Unidos y Europa se han convertido en los principales receptores de inmigrantes latinoamericanos. Se estima que existen cerca de 300.000 inmigrantes infectados con *T. cruzi* en USA y la infección se ha extendido a países como España, Italia, Canadá, Australia, Japón y Francia (Figura 3) (Ribeiro *et al.*, 2012; Steverding, 2014; Bern, 2015; Bonney *et al.*, 2017).

De acuerdo con datos publicados por la OMS para el año 2018, el número de personas infectadas por *T. cruzi* en América Latina era 5.742.167. Argentina, Brasil, México, Bolivia y Colombia representaron los países con mayor número de reportes de casos (WHO, 2019). Por otra parte, en Brasil, Venezuela y Colombia, se han detectado cambios en la forma de transmisión y presentación de la enfermedad, representados por un incremento en el reporte de brotes de ECh agudo por transmisión oral y la aparición de casos de ECh en zonas próximas a los centros urbanos donde la transmisión de *T. cruzi* era inusual (Díaz *et al.*, 2015). Todos estos hechos, han resultado en un nuevo escenario epidemiológico que plantea nuevos retos a los sistemas de salud para la prevención y el control de esta enfermedad (Cucunubá *et al.*, 2017).



Figura 3. Distribución global de individuos infectados con *Trypanosoma cruzi*. Tomado de: Ribeiro *et al.*, 2012.

En Colombia, se estima que hay 437.960 personas infectadas y 4.800.000 individuos están en riesgo de adquirir la infección (INS, 2018). Esta enfermedad es prevalente a lo largo del valle del río Magdalena, el altiplano cundiboyacense, la región del Catatumbo, la Sierra Nevada de Santa Marta, el piedemonte llanero y la Serranía de la Macarena. Los departamentos con las mayores tasas de infección con *T. cruzi* son: Boyacá, Santander, Casanare, Norte de Santander, Arauca, Cundinamarca y Meta (Figura 4) (Cucunubá *et al.*, 2017). En el año 2018 se reportaron en Colombia 1089 casos de ECh, 26 en fase aguda y 1.063 en fase crónica, de estos últimos, 169 fueron notificados en el departamento de Santander (INS, 2018). Las provincias de Guanentina, Comunera y García Rovira son las zonas más endémicas del departamento de Santander (Figura 5) (Olivera *et al.*, 2019).

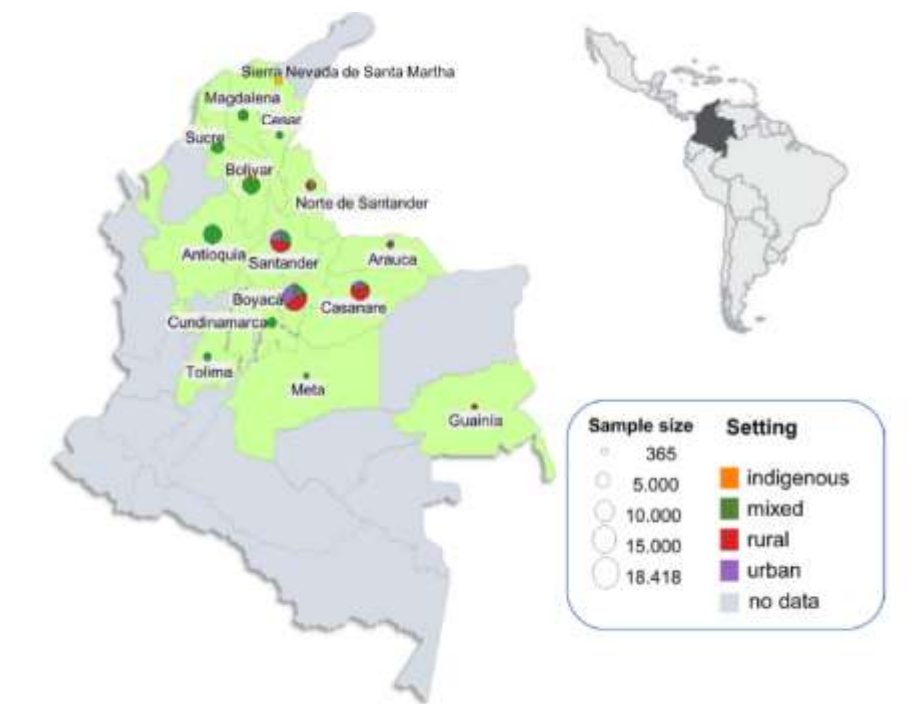


Figura 4. Distribución geográfica de la prevalencia de infección con *Trypanosoma cruzi* en Colombia. Tomado de: Cucunubá *et al.*, 2017.

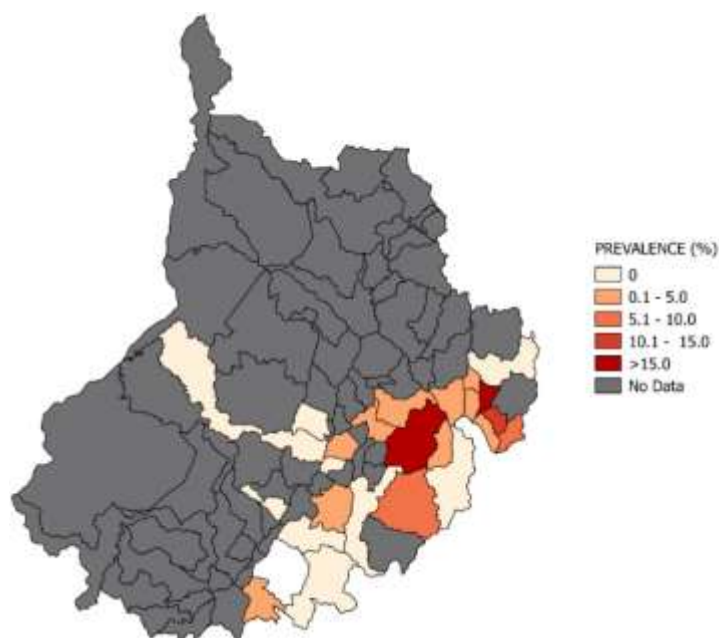


Figura 5. Prevalencia de la enfermedad de Chagas en el departamento de Santander. Tomado de: Olivera *et al.*, 2019.

1.3.1 Mecanismos de transmisión. La transmisión de *T. cruzi* en al ser humano puede ocurrir por diversas formas.

1.3.1.1 Trasmisión vectorial. La transmisión por vía vectorial es considerada la más importante en humanos, además, es el mecanismo de transmisión más común en zonas endémicas de la enfermedad, se estima que está involucrada en al menos el 70% de los casos y se ha mantenido debido a la domiciliación de insectos vectores. Ocurre cuando los tripomastigotes metacíclicos presentes en las heces de los insectos vectores son introducidos mecánicamente por el acto de rascarse o penetran activamente el sitio de la picadura y/o mucosas (Pinazo *et al.*, 2015; Bern, 2015; Bonney *et al.*, 2017).

1.3.1.2 Transfusión de sangre y trasplante de órganos. La transfusión de sangre es considerada como la principal forma de transmisión de la ECh en países no endémicos. Ocurre por el uso de transfusiones de hemoderivados (sangre total, plaquetas, plasma fresco congelado o glóbulos rojos empaquetados) de donantes infectados a receptores sanos o inmunosuprimidos (Pinazo *et al.*, 2015). Un estudio realizado en España determinó que el 0,62% de los donantes americanos eran positivos para anticuerpos contra *T. cruzi* y que el porcentaje de prevalencia aumentaba a 10% cuando solo se evaluaban individuos provenientes de Bolivia. Datos publicados en USA, Canadá y Alemania, han reportado que de 1-5% de sus donantes son seropositivos (Pérez-Molina y Molina, 2018). Los trasplantes constituyen otra fuente de trasmisión cuando individuos infectados, sin conocer su condición donan órganos y el receptor, un paciente inmunosuprimido, desarrolla la enfermedad aguda (Barcán *et al.*, 2005; Pinazo *et al.*, 2015).

1.3.1.3 Transmisión vertical. La transmisión vertical es otra forma de transmisión de la ECh en países endémicos y no endémicos de la enfermedad. Ocurre por el paso del parásito de mujeres infectadas a sus bebés durante la gestación, el parto o mientras alimentan con leche materna. La infección durante el embarazo puede resultar en abortos o nacimientos prematuros (Pinazo *et al.*, 2015). En países endémicos de la ECh como Bolivia, Chile y Paraguay la transmisión vertical ocurre en el 5% de las mujeres embarazadas crónicamente infectadas, mientras que en el resto de los países se calcula en menos del 1% (Rassi *et al.*, 2015). El número de casos de ECh congénita se ha estimado en 14.385 por año en América Latina, de 66 a 638 por año en Estados Unidos y de 20 a 183 por año en Europa (Pérez-Molina y Molina, 2018).

1.3.1.4 Transmisión oral. La transmisión oral de la ECh es común entre animales silvestres y es accidental en humanos. Ocurre por la ingesta de alimentos o bebidas contaminadas con las heces de triatominos u ocasionalmente por secreciones de las glándulas anales odoríferas de marsupiales infectados con *T. cruzi*. Además, el consumo de carne mal cocida o sangre de animales salvajes (zarigüeya, armadillo) aumenta el riesgo de infección (Pereira *et al.*, 2009). En los últimos años, esta forma de transmisión ha llamado la atención en países como Brasil, Venezuela y Colombia por la presentación de microbrotes de enfermedad de Chagas agudo con mayor severidad y altas tasas de mortalidad (Díaz *et al.*, 2015).

1.3.1.5 Transmisión accidental. Se presenta por el contacto de la piel con micro lesiones o mucosas con elementos contaminados. Generalmente se asocia a la manipulación inadecuada de elementos de protección personal, elementos cortopunzantes o material proveniente de trabajos

experimentales de investigación contaminado con sangre de pacientes infectados, heces de triatomíneos o cultivos de *T. cruzi* (Dias *et al.*, 2011).

1.4 Aspectos clínicos de la enfermedad de Chagas

La ECh cursa con dos fases, aguda y crónica cada una de ellas con características clínicas diferentes (Figura 6) (Bern, 2015, Echeverría y Morillo, 2018).

1.4.1 Fase aguda. La fase aguda de la enfermedad generalmente cursa asintomática o presenta síntomas inespecíficos como malestar general, fiebre, cefalea, astenia, anorexia, artralgia y hepatoesplenomegalia leve; su principal característica es la presencia de alta carga parasitaria en sangre periférica y tejidos. Cuando la transmisión de la enfermedad es vectorial es posible identificar sitios de entrada del parásito a través de la piel, por la presencia de un área indurada con eritema e hinchazón denominada “chagoma” o a través de las mucosas donde se presenta un edema indoloro peri-orbital conocido como signo de “Romaña”. Las manifestaciones clínicas en la fase aguda se resuelven espontáneamente y menos del 1% de los pacientes desarrollan formas severas de la enfermedad caracterizadas por cursar con una miocarditis aguda, perfusión pericárdica y/o meningoencefalitis, asociadas al trasplante de órganos, reactivación en pacientes inmunosuprimidos y transmisión oral de la enfermedad (Andrade *et al.*, 2011; Bern, 2015; Echeverría y Morillo, 2018).

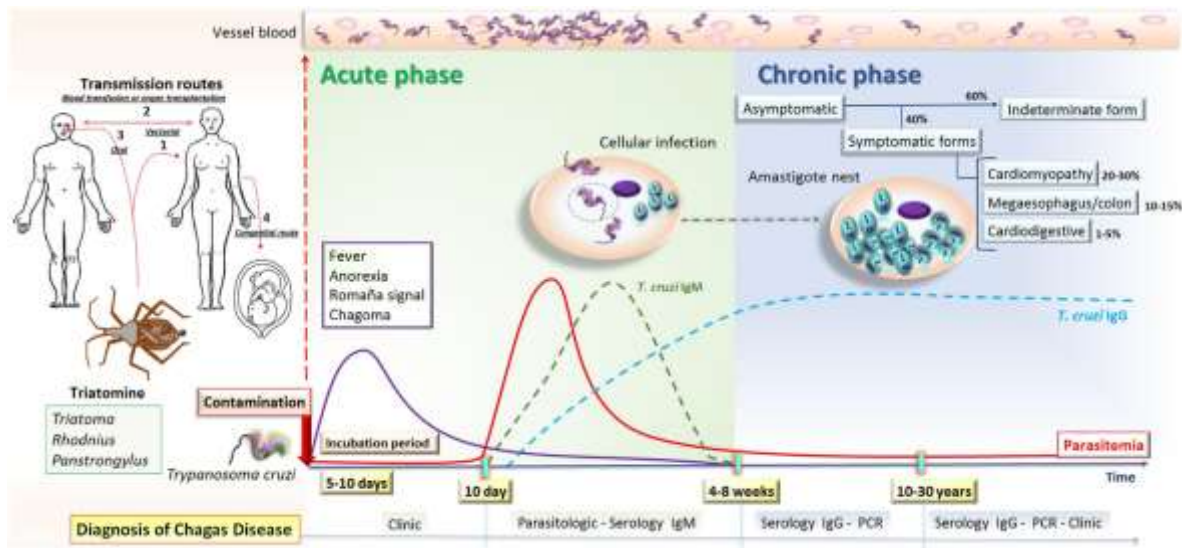


Figura 6. Curso natural de la infección humana con *T. cruzi*. Tomado de: Lindani, *et al.*, 2017.

1.4.2 Fase crónica. En la fase crónica se presentan dos formas de la enfermedad, la forma indeterminada o asintomática y la forma sintomática con compromiso cardíaco o digestivo (Rassi *et al.*, 2015; Echeverría y Morillo, 2018). La fase indeterminada se presenta en un 60 a 70% de los pacientes infectados, se caracteriza por presentar test serológicos positivos con anticuerpos IgG específicos contra *T. cruzi* y ausencia de signos físicos o síntomas de enfermedad cardíaca o digestiva; además, presenta electrocardiograma, ecocardiograma y radiografías de tórax, esófago y colon normales. (Bern, 2015, Echeverría y Morillo, 2018).

Se estima que del 30 a 40% de personas infectadas desarrollan o progresan a través de los años o décadas a la forma sintomática de la enfermedad con alteraciones cardíacas o digestivas (Echeverría y Morillo, 2018). El compromiso cardíaco es la manifestación más frecuente y seria de la fase crónica de la enfermedad, se desarrolla en el 20 al 30% de los individuos seropositivos y se presenta como una cardiomiopatía chagásica crónica (CCC) (Echeverría y Morillo, 2018; Pérez-Molina y Molina, 2018).

La CCC se considera una cardiomiopatía dilatada e inflamatoria, las características macroscópicas de la CCC incluyen cardiomegalia con alteración en forma y tamaño del corazón, dilatación auriculoventricular, fibrosis miocárdica, endocárdica y epicárdica, aneurismas apicales en el ventrículo izquierdo, adelgazamiento de la pared ventricular y formación de trombos en el endocárdico apical. En cuanto a las características microscópicamente la CCC se caracteriza por miocarditis de bajo grado acompañada de miocitolisis (necrosis de miocitos), hipertrofia de las fibras del miocardio, fibrosis intersticial (focal o difusa) y presencia de infiltrado inflamatorio con histiocitos, linfocitos, macrófagos, eosinófilos, células plasmáticas y mastocitos (Bonney *et al.*, 2017; Echeverría y Morillo, 2018).

Por otra parte, las manifestaciones clínicas de la CCC son las arritmias auriculares y ventriculares, anomalías del sistema de conducción, bloqueo de rama derecha del Haz de his, bloqueo fascicular anterior izquierdo, disfunción del nodo sinusal que conduce a bradicardia severa, bloqueos auriculoventriculares severos, taquicardia ventricular no sostenida o sostenida, extrasístoles ventriculares complejas, cardiomiopatía dilatada progresiva con insuficiencia cardíaca congestiva, aneurismas y embolias debidas a la formación de trombos en el ventrículo izquierdo dilatado (Figura 7) (Bonney *et al.*, 2017; Echeverría y Morillo, 2018; Pérez-Molina y Molina, 2018).

Aunque generalmente la CCC se clasifica como una cardiomiopatía dilatada, la distribución predominante de la fibrosis en las regiones posterior y apical del ventrículo izquierdo, la afectación del nodo sinusal y la afectación en el sistema de conducción eléctrico del corazón (bloqueo de rama derecha o bloqueo fascicular anterior izquierdo) distinguen la CCC de otras cardiomiopatías (Bonney *et al.*, 2017; Echeverría y Morillo, 2018; Pérez-Molina y Molina, 2018).

Los únicos tratamientos disponibles en los estados finales de la CCC son el implante de dispositivos de asistencia ventricular izquierda (DAVI), marcapasos y el trasplante cardiaco, sin embargo, dada la complejidad y el alto costo no están disponibles para la mayoría de los pacientes (Cunha-Neto *et al.*, 2014; Echeverría y Morillo, 2018). Los pacientes en fase crónica cardiaca terminal fallecen debido a muerte cardiaca súbita, seguido por falla cardiaca refractaria y tromboembolismo (Rassi *et al.*, 2015; Pérez-Molina y Molina, 2018). La falla cardiaca de etiología chagásica se asocia con peor pronóstico y una tasa más alta de mortalidad que la falla cardiaca por otras causas (Freitas *et al.*, 2005; Pérez-Molina y Molina, 2018).

Los pacientes con alteraciones cardiacas en la ECh se clasifican clínicamente de acuerdo con los síntomas, anormalidades radiológicas y electrocardiográficas, y cambios en la función del ventrículo izquierdo (Tabla 1) (Echeverría y Morillo, 2018).

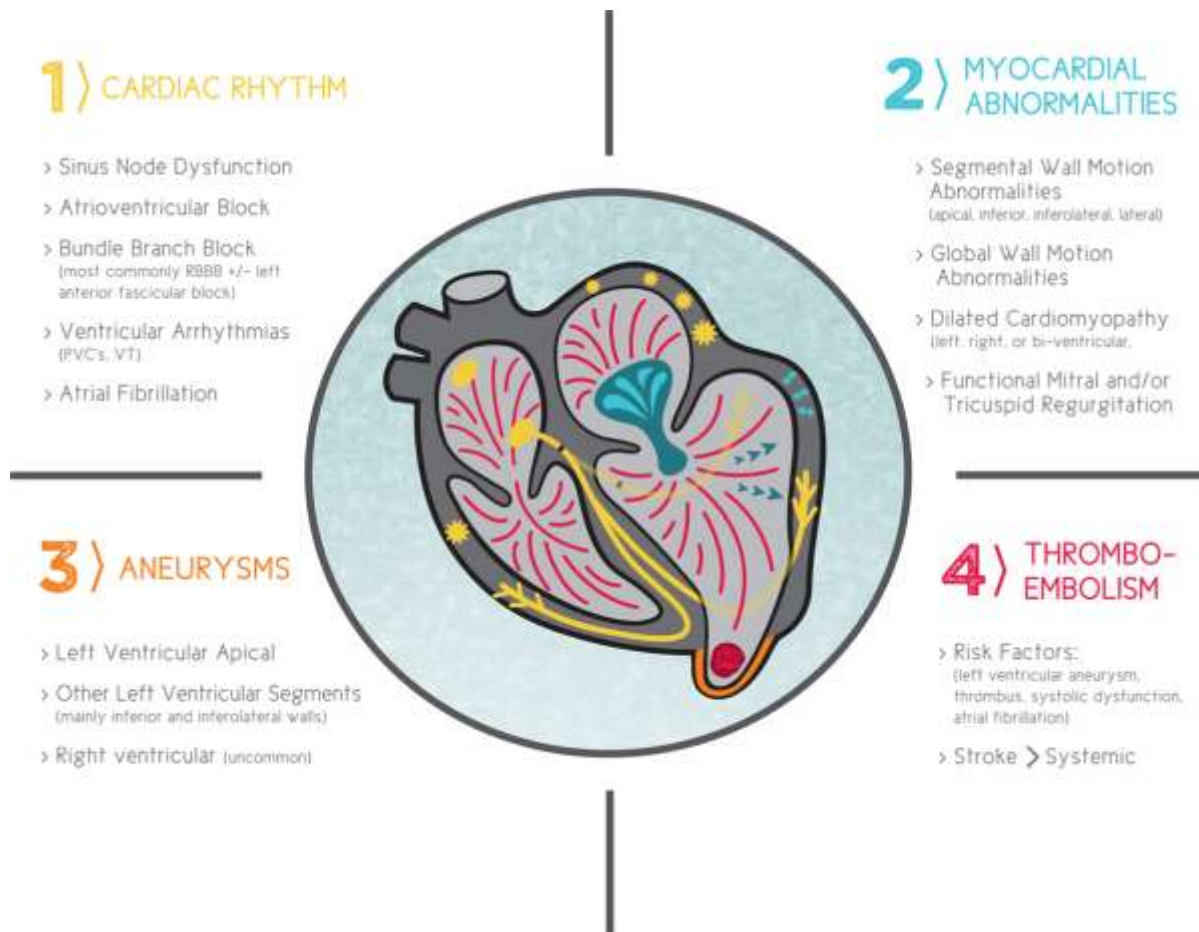


Figura 7. Trastornos mecánicos y eléctricos comúnmente observados en la cardiomiopatía chagásica crónica. PVCs, contracciones ventriculares prematuras; RBBB, bloqueo de rama derecha; VT, taticardia ventricular. Tomado de: Echeverría y Morillo, 2018.

Tabla 1.

Clasificación de la enfermedad de Chagas

Grado I	Serología positiva sin compromiso clínico, radiológico ni electrocardiográfico de lesión cardíaca.
Grado II	Serología positiva con sintomatología moderada a nula, radiología normal o indicativa de hipertrofia cardíaca leve o con alteraciones electrocardiográficas como: extrasístoles, bloqueo aurículo-ventricular incompleto, bloque completo o incompleto de la rama derecha del haz de His, bloqueo completo o incompleto de la rama izquierda del haz de His,

alteraciones primarias de repolarización.

Grado III Serología positiva con sintomatología evidente, hipertrofia cardiaca moderada y alteraciones electrocardiográficas como: bloqueo completo de la rama derecha del haz de His con desvío del eje eléctrico medio QRS para la izquierda (hemibloqueo anterior izquierdo), zonas eléctricas inactivas, bloqueo aurículo-ventricular completo, fibrilación o flutter auricular.

Grado IV Serología positiva con sintomatología pronunciada con insuficiencia cardiaca. Estudio radiológico que muestre cardiomegalia extrema o electrocardiograma con alteraciones graves o múltiples (arritmias completas y graves zonas eléctricamente inactivas).

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

La forma digestiva de la enfermedad afecta del 10 al 15% de los pacientes crónicamente infectados y se presenta en países localizados al sur del continente americano como Argentina, Brasil, Bolivia y Chile. Las manifestaciones clínicas en esta forma de la enfermedad son el resultado en el deterioro del sistema nervioso entérico, que conduce a alteraciones en las funciones de absorción, motoras y secretoras del esófago y del tracto gastrointestinal. La afectación esofágica varía desde una acalasia leve hasta un megaesófago grave, que se caracteriza por disfagia, odinofagia, reflujo esofágico, malnutrición, regurgitación y mayor riesgo de carcinoma esofágico. Por otra parte, la afectación colónica típicamente se manifiesta con afectaciones a nivel del segmento sigmoide del colon con estreñimiento prologando, distensión abdominal y megacolon, que puede complicarse a fecaloma y obstrucción intestinal (Bern, 2015; Pérez-Molina y Molina, 2018).

Algunos autores han descrito la forma cardio-digestiva de la enfermedad caracterizada por la combinación de enfermedad cardiaca con megaesófago y/o megacolon. En algunos países es usual

que el megaesófago preceda a la aparición de la enfermedad cardíaca o del colon y se estima que la prevalencia de esta manifestación clínica es del 1 al 5 % de los pacientes seropositivos, sin embargo, no se han realizado estudios apropiados que permitan entender esta manifestación de la enfermedad (Rassi *et al.*, 2015).

1.5 Diagnóstico de la enfermedad

El diagnóstico de la enfermedad en la fase aguda se realiza mediante observación microscópica directa de los tripomastigotes en la sangre o *buffy coat* y, ocasionalmente, en otros fluidos corporales, como el líquido cefalorraquídeo. Los parásitos pueden visualizarse mediante exámenes directos de sangre fresca, frotis o extendidos de sangre periférica coloreados con Giemsa, gota gruesa, métodos de concentración como el microhematocrito (microstrout) y el strout. También puede emplearse el hemocultivo en medio bifásico Novy-Mc Neal-Nicoll (NNN) e infusión de hígado y triptosa (LIT) y el xenodiagnóstico (Bern, 2015; Balouz *et al.*, 2017). La reacción en cadena de la polimerasa (PCR) representa una herramienta diagnóstica sensible en la fase aguda y es útil para realizar una detección temprana de la reactivación de la infección en pacientes trasplantados inmunosuprimidos, fracaso del tratamiento antiparasitario y en la transmisión congénita, accidental y oral. La sensibilidad de esta en la fase crónica de la enfermedad es variable y depende de algunos aspectos como el volumen de la muestra, las condiciones de procesamiento, los iniciadores empleados y las condiciones de amplificación (Schijman *et al.*, 2011; Balouz *et al.*, 2017).

En la fase crónica el diagnóstico se realiza por métodos inmunoserológicos para la búsqueda de anticuerpos de tipo IgG contra *T. cruzi*. Las pruebas más comunes son la inmunocromatografía,

ensayo por inmunoabsorción ligado a enzimas (ELISA), inmunofluorescencia indirecta (IFI) y hemaglutinación indirecta (HAI). Un único ensayo no tiene la suficiente sensibilidad y especificidad para realizar el diagnóstico en la fase crónica, por esto, se requiere el uso de al menos dos ensayos serológicos con diferentes configuraciones antigénicas (extractos antigénicos totales y antígenos recombinantes o péptidos sintéticos de *T. cruzi*) para confirmar el diagnóstico de la enfermedad (Bern, 2015; Balouz *et al.*, 2017).

En pacientes con un diagnóstico inmunoserológico confirmado, se debe realizar una evaluación clínica de las complicaciones viscerales de esta enfermedad. Cuando se sospecha de compromiso cardíaco, la electrocardiografía de reposo (ECG) debe realizarse como examen inicial, la ecografía cardíaca (ecocardiograma) se debe utilizar de forma rutinaria, especialmente en pacientes con trastornos severos observados en el ECG, en hombres mayores de 30 años y mujeres mayores de 45 años seropositivos. En pacientes sintomáticos se deben considerar pruebas cardíacas adicionales, como la monitorización Holter durante 24 h, ergometría (prueba de esfuerzo) y resonancia magnética nuclear cardíaca (RMN), además, varios biomarcadores, como NT-proBNP (prohormona N-terminal del péptido natriurético cerebral) y Hs-cTnT (troponina cardíaca ultrasensible), se han asociado con diferentes estadios y gravedad de la CCC. Por otra parte, la ingestión de bario y el enema son los procedimientos de diagnóstico más comunes utilizados para evaluar la afectación gastrointestinal (megacolon) y en el megaesófago la manometría esofágica es el test de referencia más utilizado (Echeverría y Morillo, 2018; Pérez-Molina y Molina, 2018).

1.6 Tratamiento

El tratamiento de la ECh puede dividirse en etiológico, es decir, tratar directamente la infección por *T. cruzi*, o no etiológico, tratar las manifestaciones de la enfermedad. El objetivo del tratamiento etiológico es lograr la eliminación del parásito y prevenir el daño a los órganos. En contraste, el tratamiento no etiológico tiene como objetivo prevenir una mayor morbilidad y mortalidad relacionadas con la fase crónica de la enfermedad (Bonney *et al.*, 2017; Echeverría y Morillo, 2018).

1.6.1 Tratamiento etiológico. Actualmente en el mercado, solo están disponibles y aprobadas en humanos dos opciones terapéuticas tripanocidas, el benznidazol y el nifurtimox. El benznidazol es un nitroimidazol, que genera especies radicales en condiciones aeróbicas y anaeróbicas tóxicas para el parásito y es el agente de elección para la monoterapia de la ECh. El benznidazol tiene una variedad de efectos secundarios como la presencia de dermatitis alérgica, polineuropatía y supresión de la médula ósea que conduce a neutropenia. Por otra parte, el nifurtimox es un nitrofurano que produce aniones superóxido altamente letales para el parásito. Los efectos secundarios del nifurtimox incluyen síntomas gastrointestinales (anorexia, pérdida de peso, náuseas vómitos y malestar abdominal). Otros efectos secundarios comunes entre estos dos medicamentos implican la afectación del sistema nervioso central (SNC), insomnio, irritabilidad y desorientación, que conducen a la interrupción del fármaco en una proporción significativa de pacientes infectados (Bermúdez *et al.*, 2016).

El tratamiento etiológico de la enfermedad debe ser considerado en infecciones agudas, independiente del mecanismo de transmisión, infección congénita, mujeres seropositivas en edad

fértil, pacientes en fase crónica con reactivación de la infección debido a terapia inmunosupresora (pacientes trasplantados) o por otras causas de inmunosupresión (VIH) y pacientes pediátricos (niños menores de 18 años) en fase crónica. Por otra parte, el tratamiento etiológico de la enfermedad en las etapas crónicas sigue siendo controvertido, debido a los perfiles de toxicidad significativos y el papel no demostrado en la prevención de la progresión hacia la CCC (Echeverría y Morillo, 2018).

1.6.2 Tratamiento no etiológico. Como se había mencionado con anterioridad, la manifestación cardíaca es la presentación clínica más frecuente en la fase crónica de la ECh, por lo tanto, el tratamiento no etiológico en este caso se debe centrar en el manejo de la falla cardíaca, las arritmias y los trastornos de la conducción. A pesar del hecho de que la ECh es una causa importante de falla cardíaca en América Latina, muy pocos estudios han incluido a estos pacientes en ensayos clínicos aleatorizados u observacionales, por ende, los beneficios de las guías recomendadas no se han establecido fácilmente en pacientes con ECh.

En principio, el manejo farmacológico de la falla cardíaca en la CCC debe parecerse al de los pacientes con falla cardíaca con disfunción sistólica. El tratamiento de falla cardíaca incluye como terapia de primera línea el bloqueo del sistema renina-angiotensina-aldosterona, ya sea con un inhibidor de la enzima convertidora de angiotensina (IECAs) o un bloqueador del receptor de la angiotensina II (ARA II), beta-bloqueadores adrenérgicos y antagonistas del receptor mineralocorticoide (ARM). Para las alteraciones arritmogénicas y disfunción miocárdica se recomienda el uso de amiodarona, en pacientes que manifiestan taquicardia ventricular sostenida, hemodinámicamente inestables quienes son tratados con cardiodesfibrilador implantable (CDI) o resincronización cardíaca para prevenir la muerte súbita. Finalmente, en los estadios más severos

de la CCC los únicos tratamientos disponibles son el implante de dispositivos de asistencia ventricular izquierda (DAVI) y el trasplante cardíaco.

En las formas digestivas de la enfermedad, no existe un tratamiento específico para las presentaciones clínicas severas (megasíndromes), el manejo endoscópico o quirúrgico es esencial y son las únicas líneas terapéuticas que han ofrecido una mejor calidad de vida a los pacientes en este estado de la enfermedad (Bonney *et al.*, 2017; Echeverría y Morillo, 2018).

2. Patogénesis de la enfermedad de Chagas

Los mecanismos involucrados en la patogénesis de la ECh aún permanecen inconclusos, algunos estudios realizados en modelos animales y el ser humano han propuesto la existencia de diversos mecanismos que podrían explicar la patogénesis de la enfermedad. El más importante es el mecanismo inmunológico; hay evidencia científica que apoya el papel de la respuesta inmune en el desarrollo de la enfermedad. (Marin-Neto *et al.*, 2007; Bonney *et al.*, 2017; Chevillard *et al.*, 2018).

El infiltrado inflamatorio observado en la CCC se compone principalmente de células mononucleares que pueden ayudar a la eliminación del parásito, pero que también se asocian con daño cardíaco. Así mismo, en pacientes con CCC es evidente un desbalance en la producción de citoquinas con exacerbada producción de citoquinas proinflamatorias de tipo Th1 (TNF- α , INF- γ e IL-12) y supresión del perfil Th2 (IL-4 e IL-10) (Bonney *et al.*, 2017). La producción de INF- γ se encuentra significativamente aumentada en pacientes con CCC por lo cual se sugiere que actúa

como mediador de la inflamación crónica y contribuye a la patogénesis de la enfermedad (Dos Santos et al., 2014; Chevillard *et al.*, 2018).

Por otra parte, estudios de expresión génica en células humanas infectadas con *T. cruzi* y estudios de metilación de ADN cardíaco han demostrado que la infección y la progresión de la enfermedad cardíaca inducen a un aumento en la expresión de genes que codifican moléculas de la respuesta inmune, proteínas de matriz extracelular, canales iónicos y moléculas involucradas en inflamación (Cunha-Neto *et al.*, 2005; Laugier *et al.*, 2017). La interacción entre la carga parasitaria y la efectividad de la respuesta inmune para controlar la replicación del parásito está asociada con el desarrollo de la enfermedad, si el control inmune no es eficiente entonces la carga parasitaria aumentará junto con la inflamación produciendo daño en el tejido (Chevillard *et al.*, 2018).

Otros mecanismos propuestos son la disautonomía cardíaca, donde la despoblación neural y daño ganglionar podrían conducir a una falla del sistema mecánico del corazón, las alteraciones microvasculares que podrían inducir a isquemia miocárdica e infartos (Marin-Neto et al., 2007) y el daño miocárdico relacionado con la persistencia del parásito (Andrade et al., 2005).

2.1 Respuesta inmune en la enfermedad de Chagas

El sistema inmune es una red interactiva de órganos, células y moléculas que tienen como función esencial la defensa del individuo frente a los microorganismos. En condiciones normales el sistema inmune es capaz de reconocer, procesar y eliminar agentes patógenos y/o elementos extraños. Por el contrario, situaciones de inmunosupresión conducen a infecciones graves o tumores mientras que la hiperactividad del sistema inmunológico se relaciona con enfermedades alérgicas y

autoinmunes. Dependiendo de la naturaleza del microorganismo patógeno, el sistema inmune desencadena mecanismos efectores de respuesta inmune innata y adaptativa que responden de manera distinta y especializada (Parkin y Cohen, 2001).

En el caso de la ECh, el control de *T. cruzi* depende tanto de la respuesta inmune innata como adaptativa e involucra las células dendríticas, macrófagos, células NK, neutrófilos, linfocitos B, linfocitos T CD4⁺ y CD8⁺, especies reactivas de oxígeno (ROS), citoquinas, quimioquinas y anticuerpos. Después de la infección con *T. cruzi* el sistema inmunológico activa procesos biológicos para asegurar un control eficaz del parásito, sin embargo, se han reportado desequilibrios en la respuesta inmune que pueden llevar a las lesiones cardíacas o digestivas. De esta forma, el daño de los tejidos durante la infección aguda es causado directamente por el parásito y la respuesta inflamatoria dada por el hospedero, mientras que en la fase crónica el equilibrio entre la respuesta mediada por *T. cruzi* y la inflamación juegan un papel importante en el desarrollo de la enfermedad (Bonney *et al.*, 2017).

El análisis de datos obtenidos de diferentes estudios ha planteado la hipótesis de que la forma indeterminada de la enfermedad se asocia con un perfil de citoquinas anti-inflamatorias representada principalmente por la expresión de IL-10 e IL-4; mientras que la forma cardíaca (CCC) está asociada con una alta producción de citoquinas proinflamatorias como el INF- γ , TNF- α e IL-12 (Bonney *et al.*, 2017; Chevillard *et al.*, 2018) (Figura 8).

2.1.1 Inmunidad innata. La interacción del sistema del complemento con *T. cruzi* es un paso principal en la respuesta inmune innata del hospedero. Se ha descrito, que los tripomastigotes metacíclicos de algunas cepas son altamente susceptibles a la lisis mediada por el complemento mientras que otras cepas son resistentes. Los tripomastigotes metacíclicos pueden ser reconocidos

por diversas moléculas del complemento como lectinas de unión a manano, ficolina, C3 y C1q, asimismo, ensayos de fijación del complemento indican que este parásito activa principalmente la vía de las lectinas y la vía alterna del complemento (Cestari y Ramírez, 2010; Lidani *et al.*, 2017).

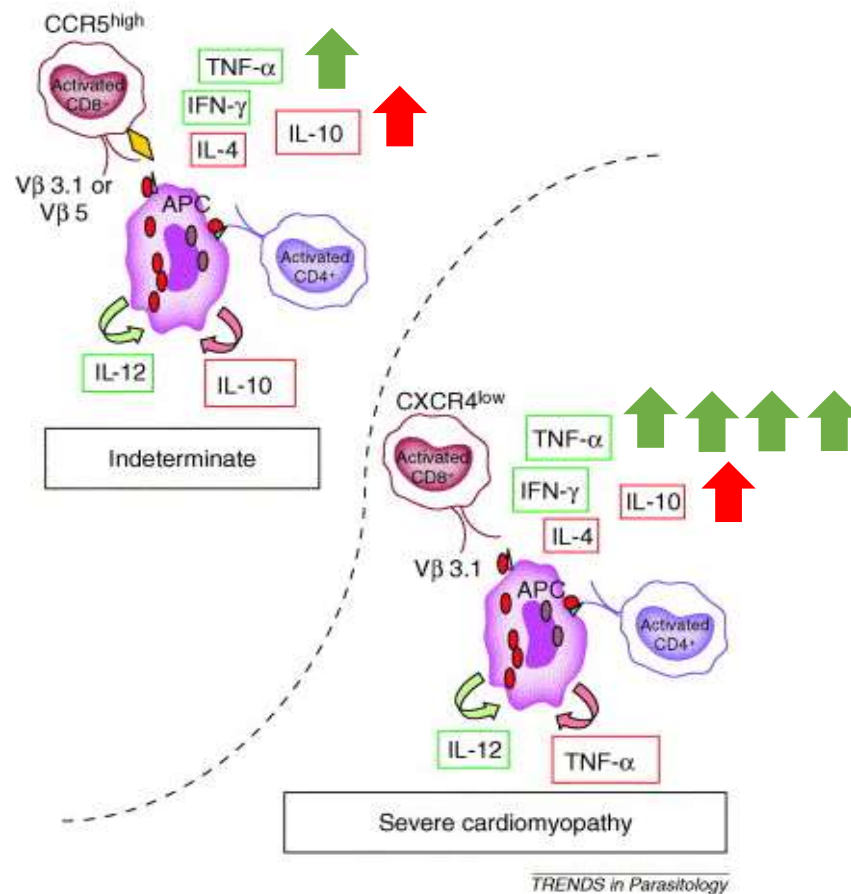


Figura 8. Diferencias en la respuesta inmune de pacientes en fase indeterminada y pacientes con CCC. Tomado de: Chevillard *et al.*, 2018

Estudios en modelos experimentales de infección con *T. cruzi*, han demostrado que las células inmunes innatas, incluidos los monocitos/macrófagos, células dendríticas, células NK y neutrófilos, desempeñan un rol importante en el control de la infección por *T. cruzi*.

Una vez ocurrida la infección, las células del sistema inmune innato reconocen al parásito a través de patrones moleculares asociados a patógenos (PAMPs) mediante receptores tipo Toll (TLR). Estos receptores desencadenan una potente respuesta inmune-inflamatoria a través del reclutamiento de moléculas adaptadoras como la proteína 88 de respuesta primaria de diferenciación mieloide (MyD88) con la subsecuente activación del factor nuclear $\kappa\beta$ (Machado *et al.*, 2012). En el caso de *T. cruzi*, moléculas de la membrana del parásito como glicosilfosfatidilinositol (GPI) y glicoinositolfosfolípidos (GIPL) son reconocidas por TLR2 y TLR4, respectivamente. Por otra parte, ADN rico en motivos CpG es reconocido por TLR9 y ARN del parásito por TLR7. Este reconocimiento induce la producción de citoquinas pro-inflamatorias y moléculas con alta capacidad tripanocida en los macrófagos, células dendríticas y células NK (Campos *et al.*, 2004; Kayama *et al.*, 2010; Bonney *et al.*, 2017).

Se ha demostrado que la activación de la vía de NF- $\kappa\beta$ y la fosforilación de MAPKs en macrófagos y células dendríticas inducen la secreción de IL-12 y TNF- α , citoquinas que a su vez median la producción de INF- γ en las células NK, favoreciendo de esta manera la diferenciación de los linfocitos Th0 hacia el fenotipo Th1. Además, en los macrófagos activados por TNF- α e INF- γ se aumenta la producción de óxido nítrico (NO) y especies reactivas de oxígeno (ROS) que conducen a una eliminación más eficiente del parásito (Campos *et al.*, 2004; Bonney *et al.*, 2017). Esta respuesta inflamatoria ayuda a controlar la replicación del parásito en el hospedero y sirve como puente hacia la respuesta inmune adaptativa. Sin embargo, se ha observado que una respuesta inmune inflamatoria exacerbada y no controlada puede causar daño en tejidos circundantes y puede estar implicada en el desarrollo de la CCC (Bonney *et al.*, 2017; Chevillard *et al.*, 2018).

En cuanto al papel de los neutrófilos, Sousa-Rocha y colaboradores, demostraron que antígenos solubles de tripomastigotes sanguíneos de *T. cruzi*, son capaces de inducir la liberación

de trampas extracelulares de neutrófilos (NET) mediante la activación de TLR2, TLR4 y la producción de ROS. Además, concluyeron que las NET no tienen capacidad tripanocida, ya que no afectan la viabilidad del parásito, pero pueden reducir su infectividad al inducir a los tripomastigotes sanguíneos a diferenciarse en amastigotes en el ambiente extracelular (Sousa-Rocha *et al.*, 2015). Cabe agregar que las células no inmunes también responden a la infección por *T. cruzi* con la producción de citoquinas. La infección de células endoteliales con el parásito conduce a la producción de IL-1 β e IL-6, mientras que en cardiomiocitos infectados exhiben un aumento en la concentración de mRNA de TNF- α e IL-1 β (Machado *et al.*, 2012).

Por otra parte, los receptores tipo Nod (receptores similares a dominios de oligomerización de unión a nucleótidos - NLR) han ganado atención en los últimos años debido a su capacidad para ensamblarse y dar origen al inflamosoma. El papel de los NLR y el inflamosoma en la regulación de la inmunidad innata contra patógenos bacterianos ha sido bien estudiado. Sin embargo, estudios recientes muestran que los NLR y los inflamosomas también desempeñan un papel en las infecciones causadas por parásitos protozoarios (Clay *et al.*, 2014).

En el caso de *T. cruzi*, se ha demostrado que la proteína NOD1 (proteína 1 que contiene el dominio de oligomerización de unión a nucleótidos) confiere resistencia a la infección por este parásito. En un modelo murino *knockout* para las proteínas NOD1 y NOD2, mostró que la ausencia de NOD1, pero no de NOD2, llevó a un aumento significativo de la carga parasitaria y mayor mortalidad, además, este estudio concluyó que macrófagos de rata deficientes de NOD1 mostraron una respuesta insuficiente al IFN- γ (Gurung *et al.*, 2016).

Se ha descrito que la activación del inflamosoma NLRP3 en la infección por *T. cruzi* también confiere resistencia a la infección (Zamboni *et al.*, 2015). Silva y colaboradores demostraron la activación de genes relacionados con el inflamosoma (*Naip5*, *Naip2*, *Panx1*, *Pycar-asc*, *Casp1*,

il18 e *il1R*) en un transcriptoma realizado de ARN del tejido miocárdico de ratones infectados. Además, observaron un aumento de la secreción de IL-1 β e IL-18 en macrófagos murinos dependiente de la activación de la caspasa-1 y demostraron que la activación del inflamosoma NLRP3 en respuesta a la infección depende de activadores establecidos, como el flujo de potasio, la producción de ROS y el daño lisosomal (Silva *et al.*, 2013). Por otro lado, en modelos murinos infectados y deficientes del inflamosoma NLRP3, proteína ASC y caspasa-1, se observó alta parasitemia y mortalidad. Otro estudio realizado en macrófagos deficientes del inflamosoma NLRP3 y la caspasa-1, demostró que éstos fueron defectuosos al eliminar a *T. cruzi*, ya que la producción de NO y ROS se vieron comprometidas (Zamboni *et al.*, 2015; Gurung *et al.*, 2016). Los mecanismos a través de los cuales ambas proteínas NLR controlan el parásito involucran respuestas mediadas por los macrófagos, sin embargo, las vías moleculares específicas deben ser aclaradas y estudiadas con más profundidad (Gurung *et al.*, 2016).

2.1.2 Inmunidad adaptativa. El componente central en la respuesta inmune adaptativa está dado por el rol que cumplen los linfocitos T y B cuyas características principales son la especificidad antigénica y la generación de memoria inmunológica. Sin embargo, las células dendríticas cumplen un papel importante en el establecimiento de la respuesta inmune adaptativa, ya que se encuentran distribuidas en los tejidos y actúan como guardianes al capturar, procesar y presentar antígenos a las células T. Se ha observado que la cantidad de células de Langerhans aumentan en el sitio de inoculación del parásito, así como en los ganglios linfáticos. Además, se ha demostrado que estas células producen IL-12 la cual es un fuerte inductor de la respuesta de tipo Th1 (Chaussabel *et al.*, 2003).

Estudios previos, han demostrado la importancia de las subpoblaciones de linfocitos T CD4+ (LTCD4+) y CD8+ (LTCD8+) en el control inmune de la infección (Giraldo *et al*, 2013; Keesen *et al*, 2012; Silverio *et al*, 2012). La evidencia experimental en pacientes con CCC y en modelos murinos infectados ha demostrado que durante la fase crónica de la infección se activa una fuerte respuesta inmune tipo Th1. A nivel de sangre periférica, se han detectado niveles altos de TNF- α , IL-12, IL-6 e INF- γ provenientes de las células mononucleares circulantes, aumento en el número de LTCD4+ y LTCD8+ y un reducido número de células Th2 productoras de IL10. Así mismo, el análisis del infiltrado inflamatorio mediante ensayos de expresión de mRNA en el miocardio proveniente de pacientes con CCC encontró aumentada expresión de INF- γ y TNF- α , así como niveles bajos o indetectables de IL-4, IL-6, IL-7, IL-15 e IL-10 demostrando que hay claramente un perfil Th1 a nivel de tejido, lo que se correlaciona con el perfil hallado en sangre periférica (Giraldo *et al*, 2013; Bern, 2015; Bonney *et al*, 2017).

Otro hallazgo interesante, se relaciona con la acumulación selectiva de células Th1 en el tejido cardiaco. Cunha-Neto y Chevillard, estudiando el miocardio de pacientes con CCC utilizando microscopía confocal y qPCR en tiempo real, encontraron células mononucleares que expresaban receptores de quimoquinas CXCR3, CCR7, CCR5, CCR4 y algunos ligandos como CXCL9, CCL9, CCL5 y CCL2, sugiriendo la importancia de estas moléculas quimio-atrayentes de la subpoblación Th1 como responsables de la acumulación de estas células en el tejido cardiaco. Estos resultados indican que el infiltrado inflamatorio de tipo Th1 predomina en el miocardio y sangre periférica de los pacientes con CCC y al parecer esta poco regulado, lo que podría explicar el daño observado en el tejido cardiaco (Cunha-Neto y Chevillard, 2014; Bonney *et al.*, 2017).

Las células Th17 han sido asociadas con la patogénesis de algunas enfermedades autoinmunes, inflamatorias e infecciosas; estas células se caracterizan por la producción de IL-

17A, IL-17F, IL-21, IL-22, IL-26 entre otras (Cai *et al.*, 2016). En la ECh, se ha estudiado el rol de la IL-17A en modelos murinos y muestras humanas y se ha encontrado que controla los niveles de parasitemia en ratones inoculados con *T. cruzi* y cumple un papel importante en la modulación de la producción de IFN- γ y TNF- α , reduciendo el daño en el tejido cardiaco (Da Matta Guedes *et al.*, 2010; Iwakura *et al.*, 2011). Un estudio realizado en individuos de regiones endémicas de Brasil mostró que los pacientes con CCC mostraron una menor expresión de IL-17A que los individuos seronegativos y los pacientes asintomáticos (Magalhães *et al.*, 2013).

Las células T reguladoras (Treg) ejercen un rol importante en procesos de inmunoregulación en varios tipos celulares (linfocitos T y B, células dendríticas, macrófagos, células NK) mediante la liberación de citoquinas como IL-1, TGF- β e IL-35 (Shevach, 2009). Datos obtenidos a partir de pacientes en fase indeterminada y cardiaca de la ECh, han mostrado un incremento en la frecuencia de las células Treg en sangre periférica de los individuos en fase indeterminada, lo cual sugiere que la expansión de las células Treg puede ser benéfica durante la fase crónica de la enfermedad, al limitar la fuerte actividad citotóxica y por ende el daño al tejido cardiaco (Vitelli-Avelar *et al.*, 2005; González & Mantilla, 2012; Bonney *et al.*, 2017).

La relevancia de los LTCD8⁺ en la protección contra la infección de *T. cruzi* se ha demostrado por el mayor predominio de la subpoblación de células T CD8⁺ en biopsias de tejido miocárdico de pacientes con CCC, además, por su habilidad para actuar como linfocitos citotóxicos frente a células infectadas con el parásito y la elevada producción de INF- γ (Silverio *et al.*, 2012). Sin embargo, la relevancia de los LTCD8⁺ no se limita solo a la fase aguda de la infección, se ha demostrado que el agotamiento de estas células durante la fase crónica provoca una exacerbación de la infección con un aumento de la carga parasitaria y la inflamación, respuesta que podría estar involucrada en la destrucción del tejido cardíaco (Guedes *et al.*, 2012).

La producción de anticuerpos específicos contra *T. cruzi* comienza bastante tarde, detectándose altos niveles cuando la parasitemia comienza a decrecer, con lo cual se ha determinado que los anticuerpos juegan un rol protector importante en la transición de la fase aguda a la fase crónica de la enfermedad. Una vez estimulados los linfocitos B, estos adquieren la capacidad de producir anticuerpos (IgM e IgG) tanto para antígenos de superficie como internos del parásito. En el ser humano se ha podido establecer que la proporción de anticuerpos específicos contra estructuras de superficie son más abundantes en la fase aguda, mientras que en la fase crónica son más frecuentes aquellos con especificidad contra antígenos internos (Jackson *et al.*, 2013).

En la infección humana, la IgM aparece primero, seguido por la IgG; en la fase aguda de la enfermedad es posible detectar los picos más altos de IgM, siendo indetectable en la fase crónica, mientras que la IgG persiste toda la vida en pacientes no tratados. La producción de IgG específica contra *T. cruzi* es dependiente del estímulo de los linfocitos T CD4⁺ y está restringida por el complejo mayor de histocompatibilidad (MHC) de clase I (Bern, 2015). Los mecanismos efectores de los anticuerpos incluyen la lisis extracelular de tripomastigotes mediada por el complemento y la inducción de cambios estructurales en la membrana del parásito (Teixeira *et al.*, 2011). Algunos estudios han señalado la importancia de los anticuerpos para la eliminación del parásito y la sobrevivencia del hospedero. Un estudio realizado en ratones deficientes en linfocitos B mostró una respuesta de susceptibilidad a la infección por *T. cruzi* demostrando altas tasas de mortalidad (Machado *et al.*, 2012; Acevedo *et al.*, 2018).

Por otra parte, se han descrito diferentes autoanticuerpos dirigidos contra componentes del endocardio, vasos sanguíneos y musculo esquelético. El anticuerpo anti-laminina reacciona contra amastigotes, tripomastigotes y la proteína laminina en humanos, este se deposita en la membrana

de miocitos y células endoteliales. Anticuerpos anti-miosina y anti-receptor adrenérgico beta, pueden inducir el desarrollo de miocarditis en ratones inmunosuprimidos y cuando se transfieren a ratones no infectados causan desórdenes en la conducción cardíaca. Se ha descrito que altos niveles de anticuerpos que reaccionan de forma cruzada con miosina cardíaca (anti-B13) y los receptores β -adrenérgicos (anti- β 1AR y anti-p2 β) están vinculados con la gravedad de la enfermedad en pacientes con CCC, siendo más abundante en aquellos que experimentan cardiomiopatía dilatada e insuficiencia cardíaca sistólica (Daliry *et al.*, 2014; Rodeles *et al.*, 2016).

La presencia de estos autoanticuerpos soportaba la hipótesis de que la autoinmunidad era la causa de la enfermedad, sin embargo, está demostrado que se requiere la presencia del parásito para el desarrollo de la patología (González y Mantilla, 2012; Bonney *et al.*, 2017). Por otro lado, la presencia de los autoanticuerpos puede deberse a la liberación de autoantígenos producto de la respuesta inmune frente al parásito, mediada por el mimetismo entre la interacción hospedero-parásito (Teixeira *et al.*, 2011; Daliry *et al.*, 2014). Alternativamente, la persistencia de *T. cruzi* en sitios anatómicos como el tejido adiposo o el intestino grueso puede ser suficiente para promover la patogénesis de la enfermedad cardíaca en ausencia de parásitos en tejido cardíaco (Ferreira *et al.*, 2011; Lewis *et al.*, 2014).

En conclusión, el acoplamiento de redes complejas de señalización que sirven de puente entre el sistema inmune innato y adaptativo repercuten en la diferenciación celular hacia un perfil de respuesta particular. De esta manera, en la ECh se relaciona con la activación de proteínas que favorecen la inflamación y una reducción en la expresión de proteínas inmuno-reguladoras (González y Mantilla, 2012; Acevedo *et al.*, 2018).

3. Estudios de Asociación

Los estudios de asociación genotipo-fenotipo se han utilizado para descubrir las variantes genéticas asociadas con susceptibilidad o resistencia en diferentes enfermedades. Con la información obtenida del proyecto genoma humano, del proyecto HapMap y el proyecto de 1000 genomas humanos, se ha abierto la posibilidad de caracterizar los patrones de variación genética en los distintos grupos étnicos de la especie humana, paso previo para poder realizar estudios a escala genómica que permitan asociar variantes genéticas con aspectos claves presentes en un determinado fenotipo. Por otro lado, la aplicación conjunta de las nuevas tecnologías de secuenciación, de herramientas bioinformáticas y de análisis estadísticos hace posible la descripción exhaustiva de las variantes genéticas que podrían contribuir en el proceso de patogénesis de una enfermedad.

Las variantes más utilizadas en los estudios de asociación genéticos son los polimorfismos de un solo nucleótido (SNPs, por sus siglas en inglés); como su nombre lo indica, son cambios puntuales de una base por otra en una posición determinada del ADN, además, son el tipo de variante más común en el genoma humano, llegando a una cifra aproximada de 38 millones de polimorfismos (Genomes Project Consortium, 2012). Los SNPs se pueden clasificar dependiendo de la posición que ocupan en la secuencia de ADN; cuando el SNP se localiza dentro de una región codificante se clasifica como SNP intragénico, por otra parte, un SNP localizado en una región proximal a una región codificante se le conoce como SNP intergénico (Frazer *et al.*, 2009). Los SNPs intragénicos se pueden clasificar de dos maneras, como SNP sinónimo, donde el cambio de

la base de ADN no produce un cambio en la secuencia de aminoácidos de la proteína que codifica, y como SNPs no sinónimos, donde el cambio de la base produce un cambio en la secuencia de los aminoácidos de la proteína que codifica (SNPs missense - cambio de sentido) o la generación de un codón de parada (SNPs nonsense - sin sentido), lo que podría originar un cambio en la funcionalidad de dicha proteína (Frazer *et al.*, 2009). Sin embargo, la gran mayoría de SNPs se encuentran fuera de regiones codificantes (SNPs intergénicos), alterando los niveles de expresión de las proteínas, por ejemplo, si se localizan en regiones promotoras de los genes, se pueden clasificar como eQTLs (Expression quantitative trait loci) (Bochud *et al.*, 2012).

En los estudios de asociación un concepto muy importante, es el desequilibrio de ligamiento (LD). El LD se define como el grado en que un alelo de un SNP se correlaciona o está ligado de manera no aleatoria con un alelo de otro SNP en un mismo loci (Pritchard y Przeworski, 2001). En el genoma de un individuo se han descrito diversos bloques de LD; estos bloques son específicos de poblaciones y se ha visto que varían de acuerdo con el origen étnico de los individuos (Gabriel *et al.*, 2002). Los bloques de LD permiten diseñar y realizar estudios de asociación genéticos de forma más eficiente y rápida debido a que, utilizando pocas variantes, se puede inferir o deducir el resto de las variantes que se encuentran en el mismo bloque o ayudan a localizar las variantes causales de un fenotipo determinado (Jorde, 2000).

El estudio de casos y controles es el tipo de enfoque más utilizado para la evaluación del riesgo genético, en donde dos grupos de individuos, uno que presenta una enfermedad o fenotipo, es comparado con otro grupo de individuos control que carecen de dicha enfermedad o fenotipo analizado (Bush *et al.*, 2012). Este tipo de estudio requiere de condiciones determinadas para otorgar mayor validez y veracidad a los resultados. En primer lugar, tanto pacientes como controles deben pertenecer a una misma área geográfica; esta condición busca que todos los individuos

incluidos en el estudio se vean expuestos a las mismas condiciones de riesgo, buscando dar más peso a la influencia genética sobre el fenotipo analizado. La segunda condición es que los individuos deben tener un mismo origen étnico, esta condición busca que las diferencias genéticas halladas entre grupos se deban principalmente al origen genético que afecte directamente el fenotipo analizado y no a diferencias genéticas relacionadas a una estratificación poblacional que afecte las frecuencias alélicas y genotípicas de los marcadores. Para realizar la comparación entre casos y controles, se evalúan las frecuencias alélicas, genotípicas y haplotípicas de las variantes estudiadas y luego se estima si existen diferencias estadísticamente significativas entre los dos grupos de individuos (McCarthy *et al*, 2008; Ruiz-Linares *et al.*, 2014).

Para los estudios de asociación existen dos estrategias principales de estudio, la estrategia de genes candidatos y los estudios de asociación del genoma completo o GWAS (Genome-wide association studies). Los análisis de genes candidatos son estudios en el que una o varias variantes genéticas, previamente seleccionadas con una hipótesis, son evaluadas frente a una enfermedad o un fenotipo determinado, este tipo de análisis presentan una desventaja ya que en algunos casos el tamaño de la muestra utilizado ha hecho que los resultados en muchos casos no sean replicados o sean controvertidos (Bush *et al.*, 2012). Por otro lado, los GWAS evalúan distintos marcadores genéticos a lo largo de todo el genoma de un individuo, razón por la cual no requieren de una hipótesis previa para su evaluación, esta estrategia permite la detección de asociaciones inesperadas y mecanismos biológicos nunca relacionados con la enfermedad de estudio, teniendo así la posibilidad de ir creando hipótesis mientras el estudio avanza. Normalmente, en un GWAS se pueden llegar a tener hasta 1 millón de variables genotipadas procedentes de las muestras, sin embargo, dada la disponibilidad de un número creciente de genomas completamente secuenciados, junto con el desarrollo de métodos de imputación eficientes, se ha expandido el poder de los

GWAS para detectar asociaciones con variantes poco frecuentes del genoma. Con el fin de dar peso a los resultados, los estudios GWAS son replicados en otras poblaciones, además de la búsqueda de resultados en diferentes bases de datos y bibliografía. (Ruiz-Linares *et al.*, 2014; León Rodríguez, 2016).

3.1 Susceptibilidad genética a las enfermedades infecciosas

Se ha planteado la hipótesis de que factores genéticos en los individuos pueden influir en el riesgo o no de padecer una enfermedad y/o desarrollar una sintomatología más severa y grave (Hill, 2006; Vannberg *et al.*, 2011). Una de las primeras evidencias que respaldó las diferencias genéticas en el riesgo de infecciones provino de un estudio epidemiológico que informó una fuerte asociación entre la muerte por infecciones en personas adoptadas y sus padres biológicos, y no con sus padres adoptivos, lo que sugirió un mayor efecto genético que ambiental (Sorensen *et al.*, 1988). Posteriormente, este hallazgo fue reforzado por otro en el que los hermanos adoptados presentaron un mayor riesgo de mortalidad en comparación con la mitad de los hermanos o individuos no relacionados (Petersen *et al.*, 2010). Además, otros estudios han mostrado diferencias étnicas en la susceptibilidad a enfermedades infecciosas (Arama *et al.*, 2015). Todos estos hallazgos confirman el rol relevante del perfil genético del hospedero en la variabilidad de la presentación clínica de una enfermedad. El creciente número de estudios de genes candidatos y GWAS ha permitido identificar polimorfismos asociados con enfermedades infecciosas, incluidas las infecciones virales, bacterianas y parasitarias, además, han permitido confirmar algunas asociaciones previamente reportadas, así como identificar nuevos genes y vías asociadas con el desarrollo de las enfermedades (Chapman y Hill, 2012).

En malaria, enfermedad causada por especies del parásito *Plasmodium* (*P. vivax*, *P. falciparum*, *P. ovale* y *P. malariae*), se encontró que una mutación en la región génica del alelo del receptor de quimioquinas Duffy (DARC) es responsable de originar un alelo nulo en individuos africanos los cuales carecen de esta proteína en sus glóbulos rojos (Tournamille *et al.*, 1995). Debido a esto, *P. vivax* no puede infectar a estos individuos ya que para invadir las células sanguíneas necesita anclarse al receptor Duffy, por esto, en población del continente africano la especie con mayor prevalencia es *P. falciparum*, cuyo cuadro de enfermedad se caracteriza por ser más severo (White *et al.*, 2014). Otro gen que se ha caracterizado como factor de riesgo a susceptibilidad de infección es el gen HBB, que codifica para la hemoglobina beta. Variaciones en este gen se han relacionado con patologías como la anemia de células falciformes, donde los glóbulos rojos por su forma ovoide y alargada son inmunes a la infección con *Plasmodium*, lo que les confiere protección a los individuos portadores de dicha mutación (Weatherall y Clegg, 2002; Gouagna *et al.*, 2010). El estudio más grande en malaria severa analizó 11.000 niños africanos, con datos de replicación en 14.000 individuos. Este estudio encontró un locus cerca de un grupo de genes que codifican receptores de eritrocitos, con alta relevancia en la invasión de este parásito (Malaria Genomic Epidemiology *et al.*, 2015). Por otro lado, un GWAS realizado en leishmaniasis identificó la región HLA clase II asociada a la leishmaniasis visceral en la población india y brasileña (LeishGEN Consortium *et al.*, 2013).

En el síndrome de inmunodeficiencia adquirida (SIDA), el cual se da por la infección con el virus de la inmunodeficiencia humana (VIH), se ha demostrado que una mutación (deleción de 32 pares de bases) en el gen del receptor de quimioquinas (CCR5) podría proteger a los individuos de la infección con el serotipo 1 del virus (VIH-1) y por ende desarrollar SIDA, esto se debe a que para infectar las células del hospedero el VIH necesita de este receptor (Michael *et al.*, 1997). Por

otra parte, se han encontrado otras asociaciones con genes del complejo mayor de histocompatibilidad (HLA) (HLA-B, HLA-C, HCP5, MICA, RNF39) y receptores de quimioquinas (CXCR6) en población europea y afroamericana, asociados o no a la progresión de la enfermedad y control de la carga viral (Blackwell *et al.*, 2009; International HIV Controllers Study, 2010).

Otra amenaza importante para la salud pública mundial es la infección causada por *Mycobacterium tuberculosis*, hasta la fecha se han publicado dos GWAS que han identifican nuevos loci de susceptibilidad en poblaciones marroquíes, gambianas y de Ghana (Grant *et al.*, 2016; Thye *et al.*, 2010). Además, un estudio piloto de secuenciación del exoma completo mostró su potencial para identificar nuevos genes de susceptibilidad en tuberculosis, como la asociación de HLA-DQA1 con tuberculosis espinal (Shen *et al.*, 2018). Otro ejemplo es el GWAS realizado en lepra, infección crónica causada por la bacteria *Mycobacterium leprae* que afecta la piel y el sistema nervioso periférico. Los resultados encontrados para esta enfermedad han llevado al descubrimiento de varios genes que se agrupan en vías inmunes innatas y confirmar asociaciones previamente observadas en la región HLA-DR-DQ (Wang *et al.*, 2018).

Tabla 2.

Genes identificados en enfermedades infecciosas, agrupados de acuerdo con fenotipos y poblaciones estudiadas

Microorganismo	Población	Loci asociado	Descripción del rasgo
<i>Virus de la Hepatitis B (VHB)</i>	Asiática	<i>HLA-DPA1, HLA-DPB1, HLA-DQB1, HLA-DQB2, UBE2L3, EHMT2, TCF19, HLA-DQA2, HLA-</i>	Susceptibilidad a hepatitis B crónica

Microorganismo	Población	Loci asociado	Descripción del rasgo
<i>Virus de la Hepatitis C (VHC)</i>	Europea	<i>DPA3, HLA-C, CFB, NOTCH4, HLA-DOA, CD40</i>	
		<i>UBE4B, KIF1B, PGD, GRIK1, HLA-DRB1, HLA-DQA, STAT4, HLA-DR</i>	Susceptibilidad al carcinoma hepatocelular relacionado con el VHB
		<i>GRIN2A</i>	Susceptibilidad a la infección
		<i>IFNL2, IFNL3/IFNL4, IFNL1, IL29</i>	Susceptibilidad a la hepatitis C crónica
	Asiática	<i>IFNL4, HLA-DQ, IL28B</i>	Resolución espontánea de infección por VHC
<i>Virus de inmunodeficiencia humana (VIH)</i>	Europea	<i>HLA-DQB1, HLA-DQA1, HLA-DR, MICA, DEPDC5</i>	Susceptibilidad a la hepatitis C crónica
	Afroamericana	<i>HCP5, PARD3B, ZNRD1, RNF39</i>	Progresión a SIDA
	Europea	<i>HCP5, HLA-B, HLA-C, MICA, HCP5, PSORS1C3, CCRL2</i>	Control de la carga viral - No progresión de la enfermedad a largo plazo
<i>Virus del papiloma humano (VPH)</i>	Europea	<i>HLA-DQB1, MICA, HLA-DRB1, HLA-DQA1</i>	Susceptibilidad a cáncer de cuello uterino
	Latinoamericana		
	Asiática	<i>EXOC1, HLA-DPB2, GSDMB</i>	Susceptibilidad a cáncer de cuello uterino
<i>Helicobacter pylori</i>	Europea	<i>TLR-1, HSPA6/FCGR2A/B</i>	Susceptibilidad a la infección
<i>Mycobacterium tuberculosis</i>	Africana	<i>SMOC1, WT1, GATA6, CTAGE1, RBBP8, CABLES1</i>	Susceptibilidad a la infección

Microorganismo	Población	Loci asociado	Descripción del rasgo
		<i>IL-12</i>	Resistencia a la tuberculosis en individuos VIH positivos.
	Europea	<i>WT1, ASAP1</i>	Susceptibilidad a la infección
<i>Mycobacterium leprae</i>	Asiática	<i>IL23R, IL1RL1, IL12B, HLA-DRB1, RAB32, TNFSF15, NOD2, BATF3, CDH18, DEC1, EGR2, CCDC88B, CIITA, SIGLEC5, RIPK2, LACC1, CYLD, SYN2, BBS9, CTSB, MED30, RIPK2, CCDC122, HLA-DQ/DP</i>	Susceptibilidad a la infección y progresión de la enfermedad
<i>Neisseria meningitidis</i>	Europea	<i>CFH, CFHR3</i>	Susceptibilidad a la enfermedad meningocócica
<i>Staphylococcus aureus</i>	Latinoamericana	<i>KAT2B</i>	Susceptibilidad a la infección
	Europea	<i>HLA-DRB1</i>	Susceptibilidad a la infección por <i>S. aureus</i> en piel y tejidos blandos
<i>Leishmania donovani/Leishmania infantum</i>	Asiática	<i>HLA-DRB1-HLA-DQA1</i>	Susceptibilidad a la leishmaniasis visceral
<i>Plasmodium falciparum</i>	Africana	<i>HBB, ABO, ATP2B4, MARVELD3, FREM3/GYPE</i>	Susceptibilidad a malaria grave

Nota. Tomado de: (Mozzi *et al.*, 2018)

De acuerdo con los hallazgos anteriores, se puede concluir que los factores genéticos del hospedero están involucrados en la susceptibilidad a la infección y al desarrollo de diferentes fenotipos en diversas enfermedades infecciosas (Chapman *et al.*, 2012; Vannberg *et al.*, 2011; León Rodríguez, 2016). En la tabla 2 se hace un breve resumen de diferentes estudios de asociación realizados en enfermedades infecciosas.

3.2 Susceptibilidad genética a la enfermedad de Chagas

En relación con la ECh se considera que la etiología de ésta es de carácter multifactorial o complejo, es decir, el fenotipo clínico es el resultado del efecto aditivo y la interacción de múltiples variantes en genes del hospedero, factores ambientales y del patógeno. Los factores genéticos son los principales determinantes de rasgos complejos debido a que los SNPs podrían influir en la interacción de vías necesarias y suficientes para el desarrollo e incluso progresión de una enfermedad poligénica (Marian, 2012).

Como se mencionó anteriormente, del total de individuos infectados por *T. cruzi*, aproximadamente del 30 a 40% desarrollarán o progresarán a través de los años o décadas a la forma sintomática de la enfermedad con alteraciones cardíacas (CCC) o digestivas (Bern, 2015). Esta variabilidad en el pronóstico de los individuos ha despertado el interés de biólogos moleculares y genetistas, en estudiar los factores genéticos del hospedero que puedan estar involucrados en el grado de susceptibilidad a desarrollar una de las formas severas de la enfermedad. Un estudio realizado en Brasil describió que ciertas características fenotípicas de la enfermedad se presentaban de forma diferenciada en grupos familiares dentro de una misma área geográfica endémica. Al realizar un análisis detallado, se logró determinar que la heredabilidad de

características tales como seropositividad de anticuerpos IgG contra *T. cruzi* en diferentes miembros de la familia y complicaciones en fase crónica de la enfermedad era de 0,56, lo que indica en este caso, que el fenotipo de los individuos depende hasta un 56% del componente genético de los mismos (Williams-Blanguero *et al.*, 2011).

En diferentes países endémicos de la ECh, (Colombia, Bolivia, Brasil, Perú, Chile, Venezuela y México) se han utilizado estudios de casos y controles en genes y SNPs candidatos y se ha evaluado su asociación o no con la susceptibilidad o protección a la infección con *T. cruzi* y/o desarrollo y gravedad de la CCC. Estos SNPs se ubican principalmente en la región del complejo mayor de histocompatibilidad (MHC) (Tabla 3), citoquinas, quimioquinas y sus receptores (Tabla 4) y moléculas importantes en la respuesta inmune e inflamatoria (Tabla 5) (Vasconcelos *et al.*, 2012; Ayo *et al.*, 2013; Cunha-Neto y Chevillard, 2014; Shaw, 2017, Ortega Zamora *et al.*, 2017; Acosta-Herrera *et al.*, 2019). En algunos casos, estos estudios se han replicado y se han encontrado resultados discordantes que pueden deberse al poder estadístico limitado de los estudios, tamaño de muestra evaluado y la heterogeneidad genética presentada entre las diferentes poblaciones de América Latina (Acosta-Herrera *et al.*, 2019).

Estudios realizados por el GIEM, en población colombiana han reportado la asociación o no de polimorfismo en los genes *TNFA*, *TGFB1*, *IL1*, *IFNG*, *IL12*, *IL4*, *CCR2*, *CCR5*, *IL17A*, *IL18*, *FOXO3*, *VDR*, *TYK2* y sus haplotipos con susceptibilidad a la infección con *T. cruzi*, desarrollo y/o progresión de la CCC (León Rodríguez *et al.*, 2018, León Rodríguez *et al.*, 2016; León Rodríguez *et al.*, 2015; Machuca *et al.*, 2014; Flórez *et al.*, 2012; Criado *et al.*, 2012; Flórez *et al.*, 2011; Torres *et al.*, 2010; Zafra *et al.*, 2007).

Hasta el momento, solo un estudio de asociación del genoma completo (GWAS) ha sido llevado a cabo en 523 pacientes seropositivos para anticuerpos contra *T. cruzi* con diferentes

grados de afectación cardíaca, sin embargo, por el limitado tamaño de la muestra, no se encontraron asociaciones estadísticamente significativas a nivel genómico (Deng et al., 2013).

Tabla 3.

Genes del MHC asociados o no a infección y/o formas crónicas sintomáticas de la Ech en distintas poblaciones endémicas de Latinoamérica. CCC, cardiomiopatía chagásica crónica.

Gen	Alelo	Población	Asociación
HLA clase I y II			
HLA-A	A*68	México	CCC
	A*30	Brasil	Todas las formas crónicas de la Ech
	B*39	México	Infección y CCC
HLA-B	B*35	México	CCC
	B*40	Chile	CCC
	B*14:02	Bolivia	Todas las formas crónicas de la Ech
HLA-C	C*03 en LD con B*40 y B*15	Venezuela	CCC
	KIR2DS2 (HLA-C1)	Brasil	CCC
	Haplotipo DRB1*14-DQB1*0301	Perú	Infección
HLA-DRB1	DR16 y DR4	México	Infección y CCC
	DRB1*1503 y DRB1*1103	Argentina	Infección y CCC
	DRB1*0409	Argentina	Infección
	DRB1*01, DRB1*08, DRB1*1501, DQB1*0501	Venezuela	CCC
	DRB1*01	Bolivia	Todas las formas crónicas de la Ech
HLA-DQB1	DQB1*0303	Venezuela	CCC

Gen	Alelo	Población	Asociación
HLA-DPB1	<i>DQB1*0302</i> y <i>DQB1*06</i>	Brasil	Todas las formas crónicas de la ECh
	<i>DPB1*0401</i> , <i>DPB1*2301</i> y <i>DPB1*3901</i>	Venezuela	CCC
	<i>MICA*011</i>	Bolivia	Infección
MICA	Haplotipo <i>DRB1*01-B*14-MICA*011</i>	Bolivia	Todas las formas crónicas de la ECh
	<i>MICA-129</i>	Brasil	CCC
	<i>MICB*008</i>	Bolivia	No asociación
MICB			
HLA-G	<i>3'UTR</i>	Brasil	Todas las formas crónicas de la ECh

HLA clase III

TNF	<i>TNFA -308, -244 and -238</i> y <i>TNFB</i>	Brasil	Controvertida
	<i>TNFA -1031C and -308A</i>	Colombia	CCC
	<i>TNFA-308</i>	México	CCC
	Haplotipo <i>TNFD3</i> , <i>TNFB7</i> , <i>TNFA8</i> ; <i>TNFA2-b4-c2-d3-e2</i> y <i>TNFA8-b1-c1-d3-e3</i>	Brasil	Infección y CCC Todas las formas crónicas de la ECh
	<i>TNFA -308, -244 and -238</i> y <i>TNFB</i>	Perú	No asociación
	<i>LTA +80</i> y <i>+252</i>	Brasil	Controvertida
BAT1	<i>BAT1 - 22C/G</i> y <i>-348C/T</i>	Brasil	CCC
CYP21A2	<i>V281L</i>	Bolivia	CCC
IKBL	<i>IKBL-62A/T</i> y <i>-262A/G</i>	Brasil	CCC

Nota: Tomado y adaptado de: (Ayo et al., 2013; Ortega Zamora et al., 2017; Acosta-Herrera et al., 2019).

Tabla 4.

Genes de citoquinas, quimioquinas y sus receptores asociados o no a infección y/o formas crónicas sintomáticas de la ECh en distintas poblaciones endémicas de Latinoamérica. CCC, cardiomiopatía chagásica crónica

Gen	Cromosoma	Nombre	Población	Asociación
Citoquinas y sus receptores				
IL1A	2	Interleuquina 1 alfa	Colombia	CCC
IL1B	2	Interleuquina 1 beta	Colombia	CCC
			México	CCC
IL1RN	2	Antagonista del receptor de interleuquina 1	México	CCC
			Colombia	No asociación
IL4	5	Interleuquina 4	Bolivia	Infección
			Colombia	No asociación
IL4R	16	Receptor de la interleuquina 4	Colombia	CCC
IL-6	7	Interleuquina 6	Colombia/Perú	No asociación
IL-10	1	Interleuquina 10	Brasil	Controvertida
			Colombia	No asociación
IL12B	5	Interleuquina 12B	Colombiana	No asociación
IL17A	6	Interleuquina 17A	Colombia	Infección y CCC
IL18	11	Interleuquina 18	Colombia	Infección
			Brasil	CCC
IFNG	12	Interferón gamma	Colombia	Infección
			Brasil	CCC
TGFB	19	Factor de crecimiento transformante beta	Colombia/Perú	Infección
			Brasil	No asociación
Quimioquinas y sus receptores				
CCR5	3	Receptor de quimiocina tipo 5 (C-C)	Perú	CCC
			Colombia	CCC
			Argentina	CCC

Gen	Cromosoma	Nombre	Población	Asociación
			Venezuela	CCC
			Brasil	Controvertida
CCR2	3	Receptor de quimiocina tipo 2 (C-C)	Colombia	CCC
			Argentina	CCC
CCL2	17	Ligando de quimioquinas 2 (C-C)	Brasil	CCC
CXCL9	4	Ligando de quimioquinas 9 (C-X-C)	Brasil	CCC
CXCL10	4	Ligando de quimioquinas 10 (C-X-C)	Brasil	CCC
MIF	22	Factor inhibidor de la migración de macrófagos	Colombia/Perú	Infección
CCL5		Ligando de quimioquinas 5 (C-C)	Brasil	No asociación
CCL17	16	Ligando de quimioquinas 17 (C-C)	Brasil	No asociación
CCL19	9	Ligando de quimioquinas 19 (C-C)	Brasil	No asociación

Tomado y adaptado de: (Ayo et al., 2013; Ortega Zamora et al., 2017; Acosta-Herrera *et al.*, 2019).

Tabla 5.

Otros genes asociados o no a infección y/o formas crónicas sintomáticas de la ECh en distintas poblaciones endémicas de Latinoamérica. CCC, cardiomiopatía chagásica crónica.

Gen	Cromosoma	Nombre	Población	Asociación
			Brasil	CCC
HP	16	Haptoglobina	Venezuela	Infección y CCC

Gen	Cromosoma	Nombre	Población	Asociación
MBL2	10	Lectina 2 de unión a manosa	Brasil	Infección y CCC
			Chile	Infección
TIRAP	11	Proteína adaptadora asociada a receptores tipo Toll	Brasil	CCC
VDR	12	Receptor de la vitamina D3	Colombia	CCC
MASP2	1	Lectina de unión a manano serina proteasa 2	Brasil	CCC
ACTC1	15	Actina 1-alfa de músculo cardíaco	Brasil	CCC
FCN2	9	Ficolina 2	Brasil	CCC
CTLA4	2	Proteína 4 citotóxica asociada a linfocitos T	Brasil	CCC
			Venezuela	No asociación
TLR1	4	Receptor tipo Toll 1	Chile	No asociación
			Brasil	No asociación
TLR2	4	Receptor tipo Toll 2	Colombia	No asociación
TLR4	9	Receptor tipo Toll 5	Colombia	No asociación
			Brasil	No asociación
TLR5/TLR9	1/3	Receptor tipo Toll 5 Receptor tipo Toll 9	Brasil	No asociación
TLR6		Receptor tipo Toll 6	Chile	No asociación

Gen	Cromosoma	Nombre	Población	Asociación
<i>PTPN22</i>	1	Tirosina- fosfatasa no receptora tipo 22	Colombia Perú	No asociación
<i>NRAMP1</i>	2	Proteína 1 de macrófagos asociada a resistencia natural humana	Perú	No asociación
<i>NOS2</i>	17	Óxido nítrico sintasa	Perú	No asociación
<i>FOXO3</i>	6	Factor de transcripción FOXO3	Colombia	No asociación
<i>TYK2</i>	19	tirosina- quinasa no receptora TYK2	Colombia	No asociación
<i>NLRP1</i>	17	Dominio de unión a nucleótidos y reclutamiento de caspasas	Bolivia	CCC

Nota. Tomado y adaptado de: (Ayo et al., 2013; Ortega Zamora et al., 2017; Acosta-Herrera *et al.*, 2019).

4. Gen *ANKRD1*

El gen *ANKRD1* codifica para la proteína de dominio 1 de repetición de anquirina (Ankiryn repeat domain containing protein 1, UniProtKB-Q1532 (ANKR1_HUMAN)), también conocida como proteína de repetición de anquirina cardíaca (CARP). El gen *ANKRD1* está ubicado en el brazo largo del cromosoma 10 (10q23.31) y su cDNA tiene una longitud de 1901 pares de bases (Miller *et al.*, 2003; Ling *et al.*, 2017) (Figura 9).

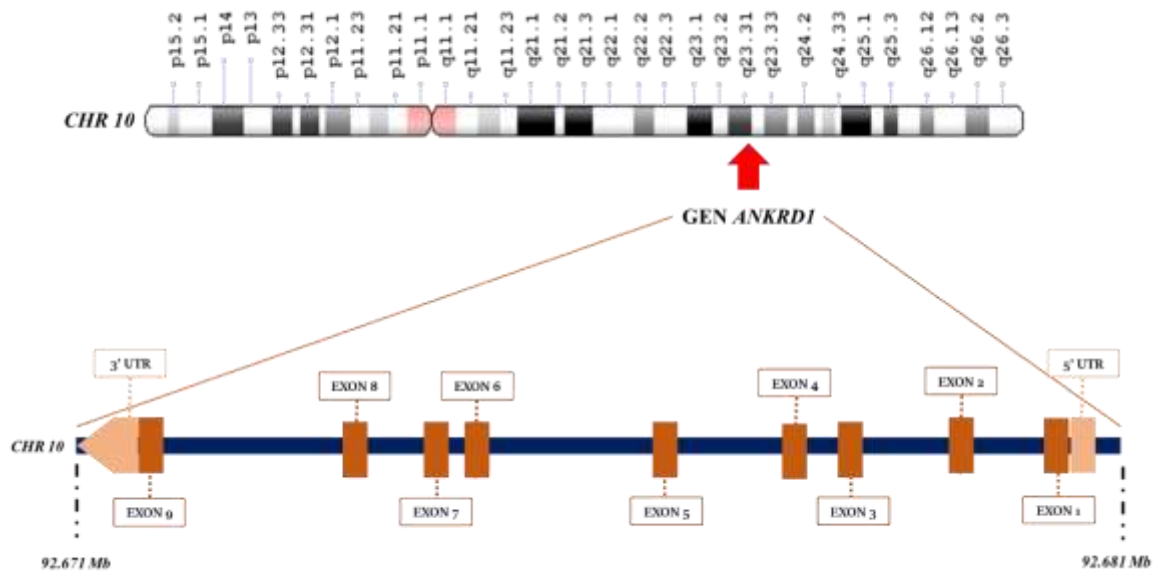


Figura 9. Localización y estructura del gen *ANKRD1*

El proyecto 1000 genomas humanos reportó 39 variantes para el gen *ANKRD1* en población colombiana. La figura 10 muestra el mapa de disequilibrio de ligamiento (LD) del gen evidenciando dos bloques con alto LD.

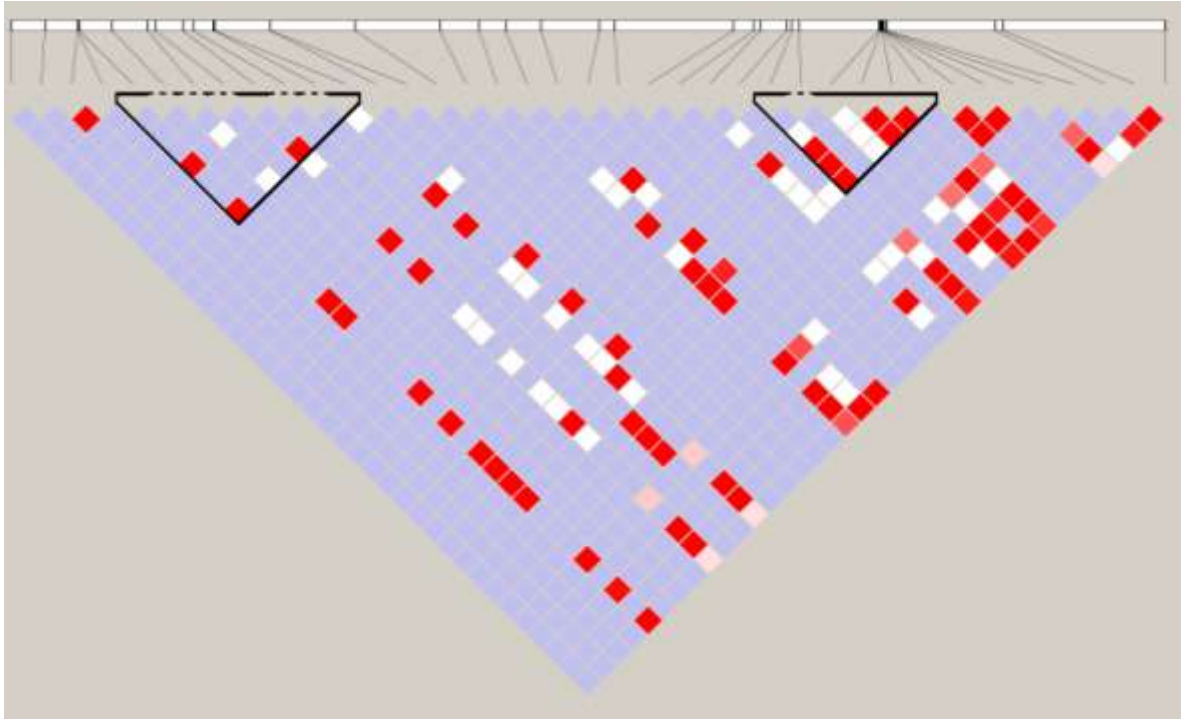


Figura 10. Mapa de disequilibrio de ligamiento del gen *ANKRD1*. Tomado de Haploview 4.2

Este gen se expresa predominantemente en el corazón embrionario, pero regula su expresión de manera negativa en el corazón adulto. La proteína codificada por este gen presenta una localización celular dual; en el núcleo del miocito, ANKR1 actúa como un regulador de la expresión génica y en el citoplasma interactúa con las proteínas sarcoméricas y ayuda a mantener la organización del sarcómero (Moulik *et al.*, 2009; Ling *et al.*, 2017).

Tabla 6.

Interacciones de la proteína ANKR1

<i>Interacción</i>	<i>Efectos funcionales</i>
<i>Factores de transcripción</i>	
YB-1	Cofactor transcripcional negativo de YB-1; miocardiogénesis
NF-kB	Cofactor transcripcional negativo de NF-kB; función anti-inflamatoria

<i>Interacción</i>	<i>Efectos funcionales</i>
Nucleolina	Corepresión de la transcripción del gen <i>MMP13</i> ; cicatrización de heridas
p53	Coactivador transcripcional positivo de p53; regulación durante desarrollo y respuesta al estrés
GATA-4	Coactivador transcripcional positivo de GATA-4; función anti-apoptótica
<i>Componentes estructurales del sarcómero</i>	
Miopalladina	Mantener la integridad estructural del sarcómero
Titina (conectina)	Detección del funcionamiento adecuado en el corazón (contracción y relajación muscular), regulación de la expresión génica
Desmina	Desconocidos
Talina-1	Regulación negativa de la expresión de p53 y regulación positiva de la expresión de miogenina.
<i>Interacción con moléculas de señalización</i>	
FHL2	Detección del funcionamiento adecuado en el corazón (contracción y relajación muscular), regulación de la expresión génica
CASQ2	El secuestro de CASQ2, resulta en una menor concentración de Ca^{2+} para regular varias vías de señalización.
Proteínas 14-3-3 (ϵ , γ y ζ)	Retención citoplasmática de ANKR1 inhibiendo sus funciones nucleares
PKC α	Secuestro de PKC α en discos intercalados del sarcómero, estrés cardíaco

ANKR1, proteína de dominio 1 de repetición de anquirina; YB-1, proteína de unión a Y-Box 1; NF-kB, factor nuclear potenciador de las cadenas ligeras kappa de las células B activadas; GATA-4, proteína 4 de unión a GATA; FHL2, proteína 2 de cuatro dominios y medio LIM;

CASQ2, calsecuestrina 2; PKC- α , proteína quinasa C alfa; MMP13, metaloproteínasa de matriz

13. Ling *et al*, 2017

Se ha reportado que ANKR1 tiene funciones pleiotrópicas ya que puede interactuar con factores de transcripción (regulando la expresión génica de diversos genes) y con componentes estructurales del sarcómero, manteniendo su integridad y función mecano-sensorial en tejido cardíaco, en la tabla 6 se resumen las principales interacciones de la proteína codificada por este gen (Ling *et al*, 2017).

En respuesta al estrés hipertrófico, la sobrecarga de presión y el estrés mecánico en el corazón, la expresión de ANKR1 aumenta e inhibe la vía de la quinasa regulada por señal extracelular (ERK) y la vía del factor de crecimiento transformante β (TGF- β), se cree que su inducción es una respuesta adaptativa y protectora para estos mecanismos. Por otra parte, el aumento de ANKR1 también exacerba el remodelado cardíaco a través de la activación de la vía de calcineurina/ factor nuclear de células T activadas (NFAT), una vía de señalización que se sabe que tiene un papel importante en la hipertrofia cardíaca. Por lo tanto, el papel de ANKR1 en la hipertrofia cardíaca sigue siendo controvertido (Ling *et al*, 2017) (Figura 12).

En la fibrosis cardíaca, ANKR1 localizada en el núcleo, interactúa con la nucleolina y dificulta la unión de activadores transcripcionales positivos al sitio promotor AP-1, lo que inhibe la transcripción del gen de la metaloproteínasa 13 (MMP13), esto limita la expresión de MMP13 a los niveles fisiológicos apropiados para permitir la reparación exitosa del tejido. Por otro lado, la expresión del gen *ANKRD1* se incrementa en ratones *knockout* (KO) para el Inhibidor del activador del plasminógeno tipo 1 (PAI-1), que a su vez induce la elevación del gen de respuesta de crecimiento temprano 1 (*Egr1*) que está asociado con fibrosis cardíaca. Además, la regulación positiva concomitante de varios genes implicados en las respuestas pro-fibróticas,

incluido *ANKRD1*, también conduce al desarrollo de fibrosis cardíaca (Samaras *et al.*, 2015) (Figura 11).

En la apoptosis la regulación por aumento del factor de transcripción GADD153 inducido por hipoxia conduce a una disminución en la expresión de la proteína ANKR1 que se ha demostrado que causa la muerte celular apoptótica. ANKR1 también actúa como un cofactor del factor de transcripción GATA-4 para inducir la expresión de *BCL2* involucrado con una respuesta anti-apoptótica. También se ha reportado en corazones estimulados con angiotensina II o inducidos a sobrecarga de presión que la sobreexpresión de ANKR1 condujo a un aumento de la apoptosis de cardiomiocitos, lo que indica que ANKR1 también podría tener propiedades pro-apoptóticas. Por lo tanto, parece que ANKR1 puede mejorar o inhibir la apoptosis en diferentes condiciones, dependiendo del tipo de estímulo patológico (Shen *et al.*, 2015) (Figura 11).

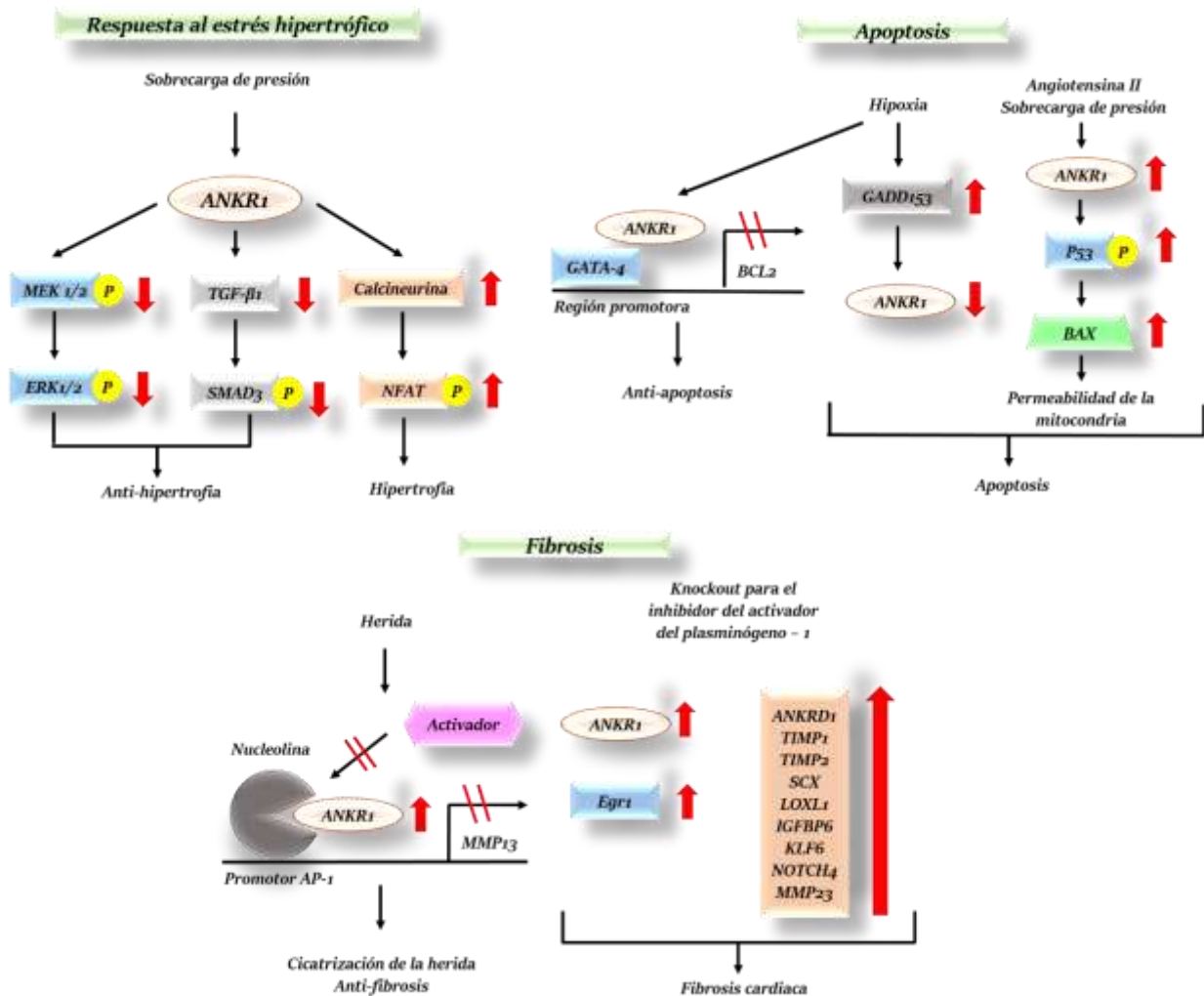


Figura 11. Funciones patológicas de la proteína ANKR1. Tomado y adaptado de: Ling *et al*, 2017

Si la sobreexpresión del gen *ANKRD1* es un factor causante en la patología cardíaca o si es simplemente una respuesta adaptativa al daño cardíaco, todavía es un tema de debate. Es intrigante que, por un lado, se haya encontrado que la expresión aumentada de ANKR1 exacerba la patología cardíaca, induce fibrosis cardíaca y aumenta la apoptosis cardíaca. Sin embargo, por otro lado, también se ha demostrado que ANKR1 protege contra la hipertrofia cardíaca, la fibrosis cardíaca y muestra propiedades anti-apoptóticas. Estos efectos aparentemente contradictorios de ANKR1 pueden ser un reflejo de sus diferentes acciones dependiendo de su localización nuclear o

citósica, los estímulos patológicos y las plataformas experimentales *in vitro e in vivo* utilizadas en los diversos estudios. Dado esto se puede especular que el aumento de la expresión del gen *ANKRD1* es más una respuesta adaptativa del corazón a mecanismos patológicos, pero cuando no se regula, puede contribuir al desarrollo de un fenotipo cardíaco maligno (Ling *et al.*, 2017).

En cuanto a la relación del gen *ANKRD1* y enfermedades cardíacas, varios estudios han publicado que la regulación positiva de este gen se relaciona con la presencia de cardiomiopatía dilatada e hipertrófica. Arimura y colaboradores, encontraron tres mutaciones con cambio de sentido (missense) en el gen *ANKRD1* (Pro52Ala, Thr123Met e Ile280Val) en tres pacientes con cardiomiopatía hipertrófica. Estas mutaciones de ganancia de función dieron como resultado un aumento de la unión de ANKR1 a titina y miopalladina (proteínas del sarcómero), lo que condujo a una localización nuclear muy reducida de ANKR1 en las células y, por lo tanto, afectó las funciones reguladoras de genes (Arimura *et al.*, 2009). En otro estudio, se identificaron tres mutaciones heterocigotas con cambio de sentido en el gen *ANKRD1* (Pro105Ser, Val107Leu y Met184Ile) en cuatro pacientes con cardiomiopatía dilatada. La mutación Met184Ile causó la pérdida de la unión de ANKR1 a talina-1 y FHL2, mientras que la mutación Pro105Ser condujo a una pérdida de la unión de talina-1. En este caso, la localización de ANKR1 en las células no se alteró, pero la pérdida de la unión a talina-1 y FHL2 (las cuales tienen importantes funciones sensoriales de estiramiento), posiblemente condujo a una interrupción de la señalización mecánica inducida por estiramiento y a la expresión génica subsiguiente (Moulik *et al.*, 2009). Un tercer estudio realizado por Duboscq-Bidot y colaboradores, identificaron cinco mutaciones con cambio de sentido (Glu57Gln, Arg66Gln, Thr116Met, Leu199Arg y Ala276Val), en 231 casos de cardiomiopatía dilatada. La mayoría de las mutaciones afectaron directamente las funciones de ANKR1 al reducir su capacidad para reprimir la transcripción a través del promotor MLC2v y

también dio lugar a una respuesta hipertrófica mal controlada hacia la fenilefrina (Duboscq-Bidot et al., 2009; Ling et al., 2017). Por otra parte, nuevos estudios donde evaluaron la prevalencia de variantes de genes asociados con el desarrollo de cardiomiopatía hipertrófica, cardiomiopatía dilatada y cardiomiopatía arritmogénica del ventrículo derecho realizando una secuenciación del exoma completo en 870 individuos caucásicos (Ng et al., 2014), 4300 individuos europeos y 2203 individuos afroamericanos (Andreasen et al., 2013), encontraron que diversas variantes, incluidas las que ya se habían reportado para el gen *ANKRD1* (Thr123Met, Ile280Val, Tyr274Cys, Pro105Ser, Val107Leu, Arg66Gln, Ala 276Val, Ala68Thr, Ala276Val, entre otras), son benignas, probablemente benignas o con conflicto de patogenicidad, despertando aún más el interés en el estudio de variantes de este gen (Andreasen et al., 2013; Ng et al., 2014).

En pacientes con insuficiencia cardíaca terminal, se encontró que los niveles de expresión del gen *ANKRD1* aumentaron significativamente en el miocardio, lo que sugiere que la regulación positiva de este gen puede desempeñar un papel importante en la progresión de la enfermedad. De acuerdo con esto, la sobreexpresión inducida del gen *ANKRD1* en un modelo murino contribuyó a la patogénesis de la insuficiencia cardíaca (Ling *et al.*, 2017). Dado que se considera que la apoptosis desempeña un papel esencial en la progresión de la insuficiencia cardíaca, se ha planteado que acciones pro-apoptóticas de ANKR1 pueden ser un factor contribuyente adverso (Bogomolovas *et al.*, 2015).

5. Gen MAP4K4

El gen *MAP4K4* codifica para la proteína quinasa quinasa quinasa quinasa 4 activada por mitógenos (Mitogen-activated protein kinase kinase kinase kinase 4, UniprotKB-O95819 (M4K4_HUMAN)), también conocida como quinasa progenitora hematopoyética (HGC); es una serina/treonina quinasa que pertenece a la familia de quinasas de mamíferos Ste20. *MAP4K4* está ubicado en el brazo largo del cromosoma 2 (2q11.2) (Virbasius y Czech, 2016) (Figura 11).

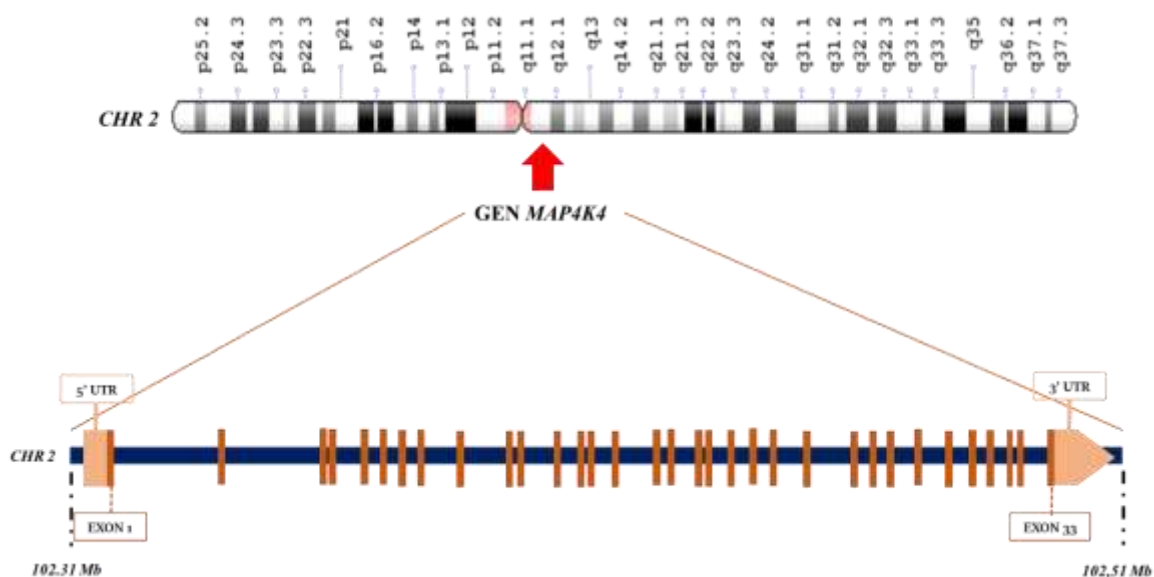


Figura 12. Localización y estructura del gen *MAP4K4*.

El proyecto 1000 genomas humanos reportó 781 variantes para el gen *MAP4K4* en población colombiana. La figura 12 se muestra el mapa de desequilibrio de ligamiento (LD) del gen evidenciando seis bloques con alto LD.

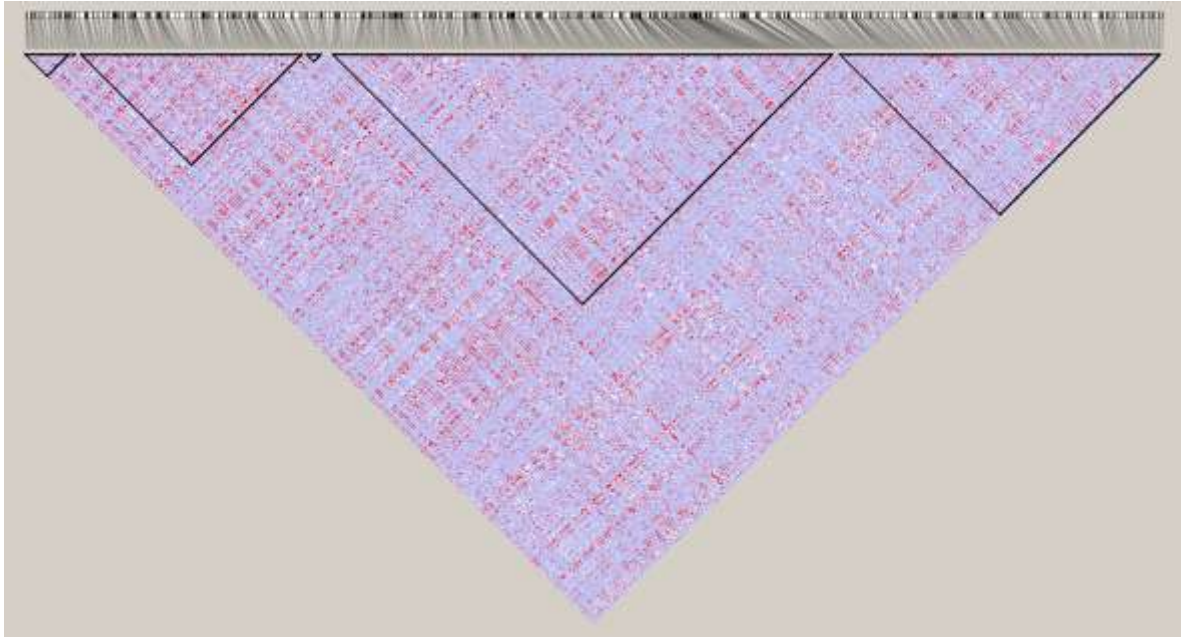


Figura 13. Mapa de desequilibrio de ligamiento del gen *MAP4K4*. Tomado de Haploview 4.2

Este gen se expresa en diferentes órganos (adiposo, cerebro, vesícula biliar, ganglio linfático, corazón, placenta, testículos, entre otros) (Gao et al., 2016). *MAP4K4* participa en vías que regulan el metabolismo energético, la inflamación y la dinámica celular, convirtiéndose en un posible blanco terapéutico en fenotipos de obesidad, resistencia a la insulina, diabetes mellitus tipo 2, aterosclerosis y cáncer (Virbasius y Czech, 2016). En modelos *knockdown* para el gen *MAP4K4*, se afectó la expresión, actividad o función de muchos factores que podrían actuar como efectores o mediadores de la señalización de este gen. Estos factores se pueden agrupar en diferentes categorías: quinasas (MAPK/JNK), factores de transcripción (NF- κ B, STAT3 y HES1), receptores transmembranas importantes para la comunicación célula-célula (Notch2 y Notch3), metaloproteinasas de matriz (MMP, MMP-2, MMP-9, MMP-7 y MMP13), reguladores negativos del supresor de tumores p53 (MDM2) y factores relacionados con la inflamación (ciclooxigenasa-2 y receptores tipo Toll) (Gao et al., 2016) (Figura 13).

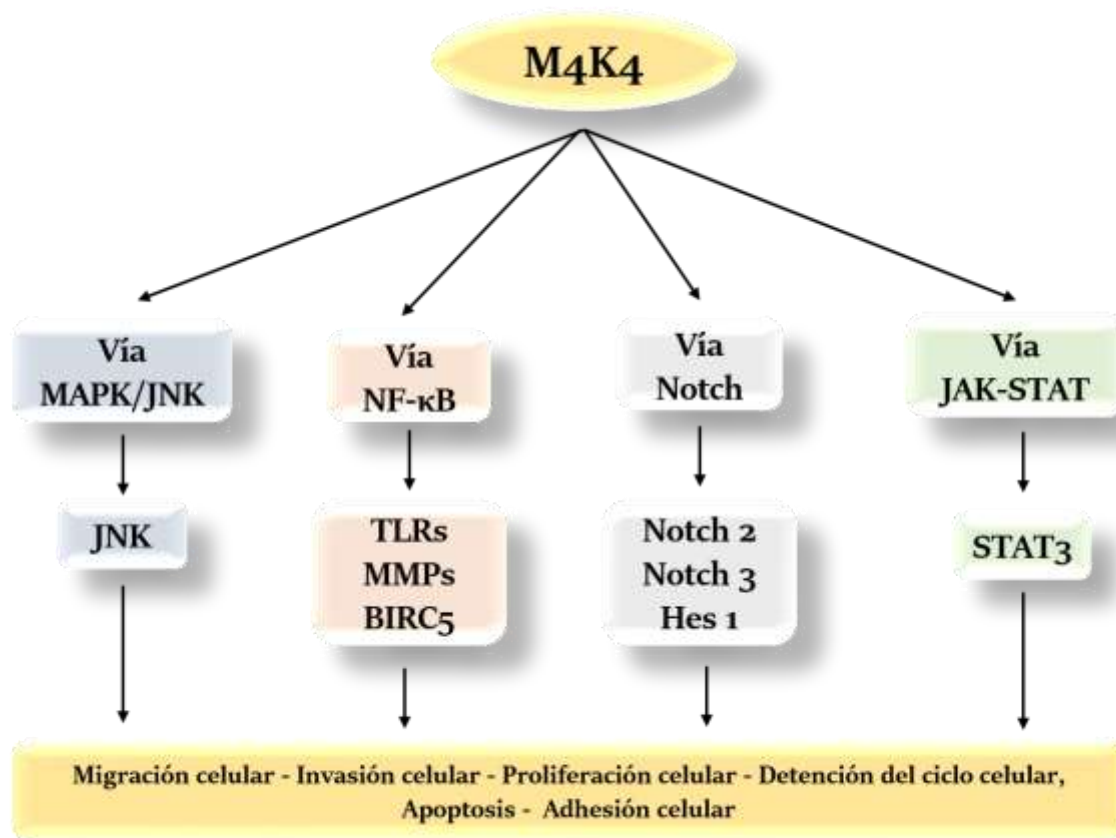


Figura 14. Interacciones de la proteína M4K4. Tomado y adaptado de: (Gao *et al.*, 2016)

Existe evidencia científica de la participación de M4K4 en la regulación de algunas funciones fisiológicas a través de diversas vías de señalización celular. Una hipótesis inicial trató de asociar a M4K4 con la ruta JNK canónica a través de la cascada de las MAP quinasas. Varias publicaciones informaron la activación de JNK por M4K4, pero en cada caso la conclusión se basó en la alta expresión ectópica de M4K4 y JNK. Ni el silenciamiento mediado por si-RNA, ni la sobreexpresión de M4K4 mediada por adenovirus, tuvieron efecto sobre la activación de JNK inducida por TNF- α en células 293. Por otra parte, en ratones *knockdown* de JNK, disminuyó el depósito de triglicéridos en los adipocitos, mientras que en el modelo *knockdown* de *MAP4K4*, aumentó la lipogénesis y la acumulación de triglicéridos. Además, la activación de TNF- α en la

vía JNK no se vio afectada por el *knockdown* de *MAP4K4* en células endoteliales de vena umbilical humana (HUVEC), aunque la expresión de la vía JNK después del tratamiento con TNF- α fue reducido por el *knockdown* de *MAP4K4* en las mismas células (Chuang et al., 2016).

Otros hallazgos indican que *M4K4* emplea la ruta NF- κ B, independientemente de la señalización de JNK, para aumentar la expresión de las moléculas de adhesión ICAM-1 y VCAM-1 en respuesta al TNF- α . La activación canónica de NF- κ B se produce por la fosforilación y degradación de I κ B, permitiendo la translocación nuclear del activador transcripcional p65 dentro del complejo NF- κ B. El silenciamiento de la expresión del gen *MAP4K4* no afectó la fosforilación o degradación de I κ B, no obstante, la actividad transcripcional de NF- κ B inducida por TNF- α , según lo evaluó un estudio de genes reporteros con luciferasa que contenía elementos de unión a NF- κ B, se atenuó cuando se silenció el gen *MAP4K4* (Virbasius y Czech, 2016). Además, utilizando inmunoprecipitación de cromatina (ChIP) en HUVECs se demostró, que la unión de p65 inducida por TNF- α a los promotores VCAM-1, E-selectina e I κ B α se redujo en células silenciadas con el gen *MAP4K4*, lo que sugiere que la proteína *M4K4* puede regular la expresión de NF- κ B a través de un mecanismo diferente. En conjunto con otros estudios que muestran la asociación de *M4K4* con las vías de inflamación, estos hallazgos sugieren un papel para la señalización de *M4K4* independiente de las cascadas de las MAP quinasas canónicas o los mecanismos de activación de NF- κ B clásicos (Virbasius y Czech, 2016). Se ha reportado que en células T *KO* para *MAP4K4* promueve la diferenciación hacia un perfil Th17 y su acumulación en el tejido adiposo conlleva a resistencia a la insulina. Sin embargo, en otro estudio reciente se concluyó que el modelo *KO* para *MAP4K4* en linfocitos condujo la inhibición de la proliferación de células T CD4⁺ y una mayor diferenciación de células T reguladoras, por lo que aún no se han establecido roles potencialmente complejos de *M4K4* en la función de las células T (Virbasius y

Czech, 2016). Fiedler y colaboradores reportaron que el gen *MAP4K4* está altamente expresado en la insuficiencia cardíaca crónica de diversas etiologías, participando en procesos de muerte celular mediada por la caspasa-3, la activación de su intermediario *TAK1* y estrés oxidativo (Fiedler et al., 2019).

Otros estudios han identificado a *M4K4* como un regulador de las proteínas involucradas en la dinámica o adhesión del citoesqueleto, incluidas ARP2/3 (proteínas relacionadas con la actina), proteína FARP1, moesina, y PYK2 (proteína tirosina quinasa sensible al calcio). La eliminación de *M4K4* en las células endoteliales alteró la dinámica de la membrana, lo que redujo la migración de las células endoteliales y afectó la angiogénesis. También se ha encontrado que *M4K4* altera la función de la permeabilidad y barrera endotelial a través de Rap-GTPasas. Es probable que estas alteraciones en la dinámica de la membrana, la adhesión y las interacciones célula-célula estén correlacionadas con las observaciones de la participación de *M4K4* en cáncer (Yang et al., 2015; Virbasius y Czech, 2016) y se relacione con vías que expliquen la fisiopatología de la CCC.

6. Justificación

La ECh constituye una de las infecciones tropicales más relevantes, siendo la principal causa de cardiopatía infecciosa a nivel mundial. La importancia de esta enfermedad radica en su elevada prevalencia, la falta de tratamientos efectivos, las grandes pérdidas económicas por incapacidad laboral y la muerte repentina de personas jóvenes aparentemente sanas (Rassi *et al.*, 2010). Esta parasitosis es considerada una enfermedad desatendida debido a los aspectos socio- económicos

de las poblaciones afectadas, las cuales se concentran en países en vías de desarrollo, postergados de las prioridades de salud pública y con estadísticas poco fiables. Representa pérdidas económicas de 1,2 billones de dólares al año basadas en los años de vida ajustados por discapacidad (AVAD) y un costo anual de 7,19 mil millones de dólares (Hotez *et al.*, 2013).

Del total de pacientes infectados, aproximadamente el 30% desarrollan manifestaciones crónicas como la CCC, ésta es la principal manifestación clínica de la enfermedad, la cual se desarrolla décadas después de la infección con peor pronóstico y mayor mortalidad que otras cardiomiopatías (Bonney *et al.*, 2017). En Colombia se calcula que hay aproximadamente 31.474 pacientes con CCC (INS, 2014). Hasta el momento no existe un consenso sobre los mecanismos que conducen al desarrollo de la CCC, solo se conoce que la inflamación y la respuesta inmune juegan un papel importante en la patogénesis de la enfermedad, por lo cual se han estudiado polimorfismos en genes que codifican para proteínas y moléculas de la respuesta inmune inflamatoria (Vasconcelos *et al.*, 2012; Ayo *et al.*, 2013; Cunha-Neto y Chevillard, 2014; Shaw, 2017, Ortega Zamora *et al.*, 2017; Acosta-Herrera *et al.*, 2019). Existen numerosos estudios de genes candidatos y polimorfismos candidatos, sin embargo, solo hay un reporte de un estudio de asociación del genoma completo (GWAS) (Deng *et al.*, 2013). Este estudio analizó 523 pacientes seropositivos para anticuerpos contra *T. cruzi* con diferentes grados de afectación cardíaca, sin embargo, por el bajo tamaño de la muestra, no se encontraron asociaciones estadísticamente significativas a nivel genómico. Estudios realizados por el grupo GIEM comparando células mononucleares de sujetos asintomáticos y pacientes con CCC retadas con *T. cruzi*, permitieron identificar genes candidatos relevantes en la patogénesis de la CCC. Dado que la CCC es una enfermedad poligénica, referido a que el fenotipo clínico es producto del efecto de múltiples variantes genéticas, identificar nuevas variantes asociadas con susceptibilidad al desarrollo o

gravedad de la CCC y su confirmación, permitirían, junto con los marcadores proteómicos y metabolómicos que están siendo estudiados por el GIEM, establecer un perfil de biomarcadores de pronóstico para identificar la población de infectados susceptibles a progresión clínica y a presentación de formas severas de la enfermedad. Por lo tanto, el conocimiento de la relación existente entre factores genéticos del hospedero y el fenotipo de la CCC conducirían a un mejor entendimiento de la patogénesis de la enfermedad. Este aspecto puede ser la base fundamental, no solo para identificar la población susceptible al desarrollo de las formas clínicas sino para la identificación de blancos terapéuticos que podrían ser utilizados como moduladores para evitar la progresión a la CCC. Por todo lo anterior, nos planteamos la siguiente pregunta de investigación ¿los SNPs de los genes *ANKRD1* Y *MAP4K4* están asociados con la CCC y su severidad en pacientes infectados con *T. cruzi*?

7. Objetivos

7.1 Objetivo General

Establecer la asociación de los polimorfismos de un solo nucleótido de los genes *ANKRD1* y *MAP4K4* y sus haplotipos con el desarrollo o gravedad de la cardiomiopatía chagásica crónica en pacientes infectados con *Trypanosoma cruzi*.

7.2 Objetivos Específicos

- Determinar las frecuencias alélicas y genotípicas de los SNPs en los genes *ANKRD1* y *MAP4K4* en pacientes asintomáticos y con cardiomiopatía chagásica crónica.
- Identificar la presencia o no de haplotipos en los genes *ANKRD1* y *MAP4K4* basados en el desequilibrio de ligamiento.
- Establecer la asociación de los polimorfismos y sus haplotipos con el desarrollo o gravedad de la cardiomiopatía chagásica crónica.

8. Materiales y Métodos

8.1 Población del estudio

Se llevó a cabo un estudio observacional, analítico, utilizando el diseño de casos y controles. El estudio incluyó pacientes mayores de 18 años quienes residieron por lo menos durante 10 años en las provincias guanentina y comunera del departamento de Santander y que tenían evidencia serológica de infección por *T. cruzi*, determinada por la presencia de anticuerpos utilizando dos pruebas de inmunoabsorción ligado a enzimas, ELISA (Grupos Bios - antígenos totales, Chile y Vircell - antígenos recombinantes, España). Los pacientes fueron reclutados en estudios de campo realizados por el Grupo de Inmunología y Epidemiología Molecular (GIEM) de la Escuela de Microbiología, Universidad Industrial de Santander (UIS) y pacientes identificados en las

consultas realizadas en la Clínica de Falla y Trasplante Cardíaco de la Fundación Cardiovascular de Colombia (FCV). A todos los pacientes se les aplicó un cuestionario donde se consignaron los datos personales, epidemiológicos y clínicos, además, todos los pacientes firmaron un consentimiento informado, aceptando participar voluntariamente en el estudio cumpliendo con las normas establecidas y con la aprobación por parte del Comité de ética de la Universidad Industrial de Santander. Todos los individuos provienen de regiones con similares condiciones ambientales y socioeconómicas. La población de la región evaluada tiene una mezcla étnica homogénea y no hay concentración de grupos étnicos.

Los pacientes seropositivos a anticuerpos contra *T. cruzi* fueron evaluados clínicamente y se les realizaron pruebas electrocardiográficas para ser clasificados en asintomáticos o sintomáticos teniendo en cuenta los parámetros estipulados por la OMS-OPS para la ECh (<http://www.fac.org.ar/7cvc/llave/c016/mordinio.pdf>). Aquellos pacientes que mostraron trastornos de la conducción y/o cardiopatía estructural en la evaluación clínica y en las pruebas electrocardiográficas fueron clasificados como sintomáticos o con CCC (fase II, III y IV de la enfermedad). Los pacientes sin alteraciones cardíacas demostradas por evaluación clínica y pruebas electrocardiográficas fueron clasificados como asintomáticos (fase I de la enfermedad). Este estudio fue aprobado y avalado por el Comité de Ética de Investigación Científica de la Universidad Industrial de Santander (CEINCI-UIS).

8.2 Selección de genes para el presente estudio

Un estudio transcriptómico realizado por el GIEM a partir de células de sangre periférica de pacientes sintomáticos y asintomáticos para la CCC, en el marco del proyecto titulado “Del

genotipo al fenotipo en la enfermedad de Chagas: análisis de rasgos cuantitativos (QTLs) y expresión diferencial entre asintomáticos e individuos con Cardiomiopatía Chagásica Crónica”, demostró niveles de expresión significativa en los genes *ANKRD1* y *MAP4K4* en las células de pacientes con CCC. Por este motivo y dada la importancia de estos dos genes en la respuesta inmune inflamatoria, su asociación con diversas enfermedades cardíacas, el hecho de contar con la información de sus SNPs y el no haber sido estudiados en la enfermedad de Chagas, nos llevó a seleccionarlos para determinar su asociación con el desarrollo o gravedad de la CCC.

8.3 Selección de polimorfismos

Se realizó la selección de SNPs para los dos genes, teniendo en cuenta los resultados obtenidos de un estudio de asociación del genoma completo (GWAS) llevado a cabo por el GIEM en el cual se utilizó la micro matriz *Global Screening Array* de Illumina y en el cual se realizó una imputación de los datos genotipados con el Servidor de Imputación de la Universidad de Michigan y datos de referencia de población latinoamericana de la fase 3 de 1000 genomas humanos. Se obtuvieron en total 21 SNPs del gen *ANKRD1* (cromosoma 10:92671853pb-92681033pb) y 676 SNPs del gen *MAP4K4* (cromosoma 2:102313312pb-101511149pb).

8.4 Genotipificación e imputación de los polimorfismos

La genotipificación de los SNPs se llevó a cabo en el servicio de genotipado Life & Brain, Alemania, haciendo uso de la tecnología de microarreglos (BeadArray) de la plataforma Illumina mediante el ensayo de genotipificación *Global Screening Array*. Esta matriz presenta un diseño

que consta de fragmentos de ADN inmovilizados en una superficie con oligonucleótidos marcados, formando una matriz de genotipado de nueva generación diseñada para estudios genéticos a escala poblacional y con contenido para el genoma multiétnico, de ahí su uso para nuestra población de estudio.

Se utilizó ADN genómico extraído a partir de 5 mL de sangre anticoagulada con EDTA, mediante el método de *salting-out* (Miller et al., 1988). La cuantificación de ADN se realizó utilizando PicoGreen® (Invitrogen, Inc., USA). El ADN fue desnaturalizado y neutralizado para ser amplificado isotérmicamente. El producto amplificado se fragmentó por un proceso enzimático de punto final controlado, luego se precipitó con isopropanol y se recogió por centrifugación a 4°C. El ADN fue activado con biotina y resuspendido en un buffer de hibridación adecuado. Se diseñaron sondas específicas de 50-mers unidas a perlas magnéticas (cada perla magnética correspondió a cada alelo por SNP – sensibilidad alélica) para realizar el proceso de hibridación en la matriz. Se realizaron varios lavados con el objetivo de eliminar el ADN no hibridado específicamente. Posteriormente, se realizó la extensión enzimática de base única con iniciadores marcados con sustancias fluorescentes (especificad alélica). Por último, se analizó la señal de fluorescencia mediante un escáner de fluorescencia (BeadArray Reader) el cual a través del software Illumina BeadStudio, asignó valores de intensidad de la señal de fluorescencia a partir de una línea basal. Estos datos fueron normalizados y se dio información de la presencia o no del alelo del SNP en la muestra de ADN. Los valores posteriores fueron agrupados en genotipos para cada muestra.

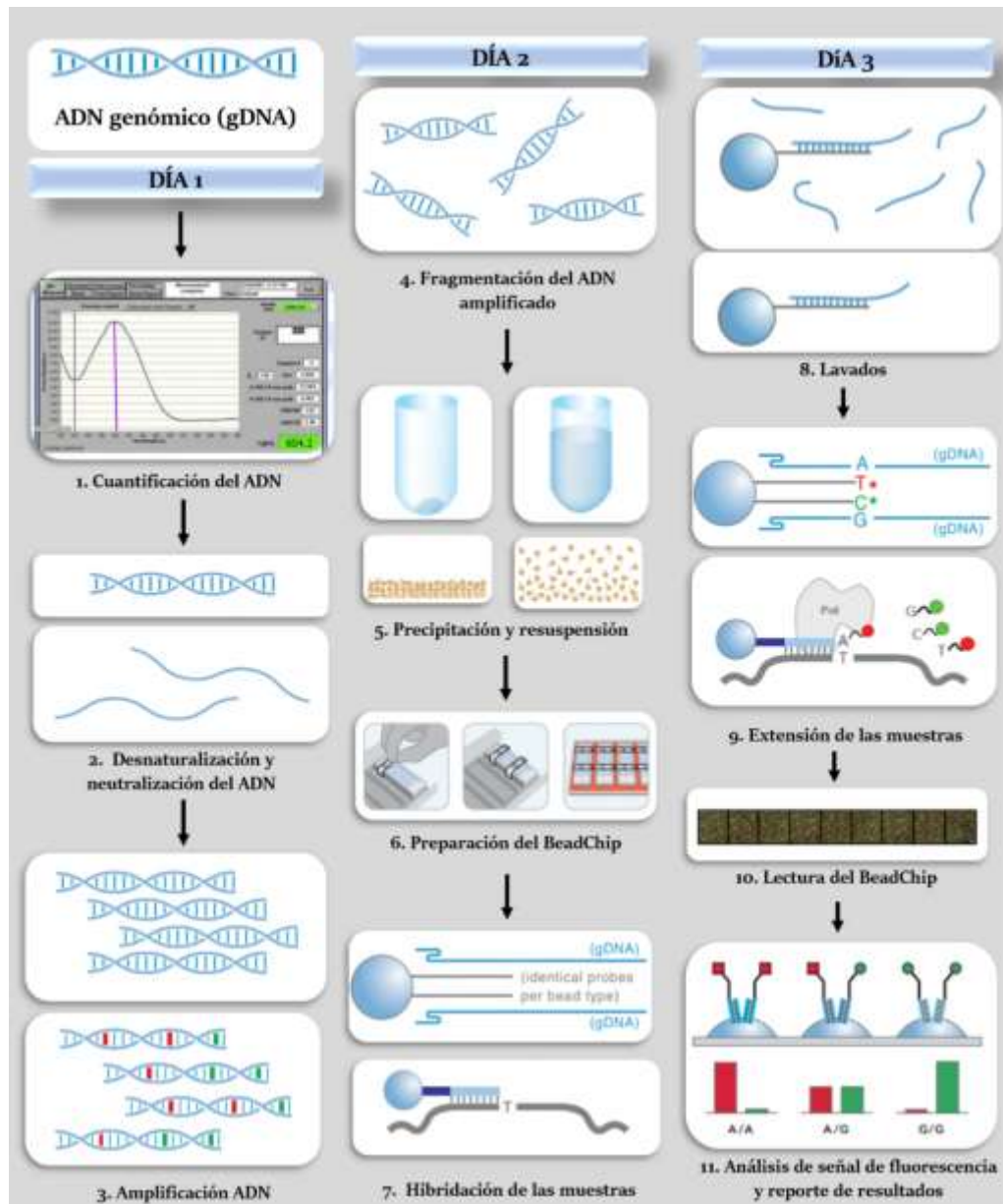


Figura 15. Ensayo de genotipificación. Tomada y adaptada de Illumina, Inc. 2016

La imputación de los datos se realizó con el Servidor de Imputación de la Universidad de Michigan (“Michigan Imputation Server”) (Das *et al.*, 2016) y datos de referencia de población latinoamericana de la fase 3 de 1000 genomas humanos. Este servidor de imputación trabaja con el algoritmo Minimac3, el cual calcula bloques de haplotipos dentro de la muestra de estudio y los

compara con los haplotipos de la población de referencia para inferir mediante análisis bayesianos, genotipos que no fueron obtenidos con la micro-matriz de genotipado.

8.5 Análisis estadístico

Se realizó un análisis descriptivo de las características de la población estudiada (edad, sexo y clasificación clínica). Los test estadísticos se ejecutaron en el software PLINK V1.9 (Purcell *et al.*, 2007). La estructura de la población se determinó mediante el cálculo del coeficiente de Wright (F_{ST}) en 697 marcadores imputados en la población del estudio. Se realizó un control de calidad para los datos obtenidos. Los SNPs con frecuencia alélica menor (MAF) de $<0,01$ y desviación del equilibrio de Hardy-Weinberg $<0,01$ fueron eliminados. Se analizaron los patrones de disequilibrio de ligamiento (LD) de los SNPs analizados y se determinó bloques de haplotipos con el método de Gabriel *et al.*, usando el software Haploview 4.2 (Barret *et al.*, 2005).

Se compararon las frecuencias alélicas, genotípicas y haplotípicas entre los pacientes del estudio para identificar la presencia de asociaciones genotipo-fenotipo mediante un test de χ^2 y un modelo de regresión logística usando covariables como la edad y el sexo en caso de ser necesarios. Se consideró asociación alélica, genotípica o haplotípica de los polimorfismos con la susceptibilidad o protección al desarrollo o gravedad de la CCC, cuando se obtuvo un valor de $p < 0,01$ y un $OR \neq 1$ con un intervalo de confianza del 95%. El poder estadístico del estudio se calculó con la herramienta “Power Calculator for Genetic Studies (CaTS)” (Skol *et al.*, 2016).

8.6 Consideraciones Éticas

De acuerdo con la norma internacional establecida en el informe BELMONT (febrero, 1976), donde se estipulan los principios y guías éticas para la protección de los sujetos humanos de investigación y teniendo en cuenta la Resolución 008430 de Octubre 4 de 1993 del Ministerio de Salud de Colombia, en la cual se establecen las normas científicas, técnicas y administrativas para la investigación en salud y en cumplimiento con los aspectos mencionados de la presente Resolución se tuvieron en cuenta los siguientes aspectos:

Las actividades que se ejecutaron en este trabajo pertenecen a la categoría de **“investigación sin riesgo”**. Los pacientes que fueron incluidos en este estudio son aquellos quienes, en el consentimiento informado del proyecto “Estudio multicéntrico para la evaluación de marcadores genéticos asociados al desarrollo de la Enfermedad de Chagas en Colombia” realizado por el Grupo de Inmunología y Epidemiología Molecular (GIEM), autorizaron el almacenamiento de sus muestras en el Laboratorio Central de Investigaciones, así como su uso posterior en investigaciones relacionadas con la genética de la enfermedad de Chagas. La información que se tiene de estos pacientes tiene como único objetivo fines investigativos, no se mencionará el nombre de los sujetos participantes y la confidencialidad de los datos se mantendrá de acuerdo con el Artículo 8 de la Resolución 008430 del Ministerio de Salud. Los datos serán manejados con las medidas técnicas, humanas, administrativas y éticas necesarias para otorgar seguridad a los registros, para evitar su falsificación o acceso no autorizado como lo indica la Ley estatutaria No. 1581 de 2012 del Congreso de Colombia, el Decreto 1377 del 2013 de la Presidencia de la República de Colombia y la Resolución No. 1227 de 2013 de la Rectoría de la Universidad Industrial de Santander (UIS) sobre protección de datos personales.

La bioseguridad de los investigadores cumplió con los protocolos institucionales de bioseguridad y protección consignados en el Manual de procedimientos para los laboratorios de microbiología (UIS). El personal involucrado en la investigación fue idóneo y competente en el manejo, manipulación, transporte, utilización de muestras sanguíneas, descontaminación y eliminación de desechos. Se realizó la disposición adecuada de los residuos químicos y/o biológicos teniendo en cuenta lo estipulado en el Decreto 351 de 2014 de la Presidencia de la República de Colombia y los protocolos establecidos en el Plan de Gestión Integral de Residuos (PGIR) de la UIS.

9. Resultados

9.1 Análisis de la población

9.1.1 Variables demográficas. La población del estudio estuvo conformada por 1499 individuos provenientes de zonas endémicas del departamento de Santander. La distribución por edad y género mostró diferencias estadísticamente significativas, por lo cual estas dos variables fueron incluidas como covariables en el modelo de regresión logística aplicado en el análisis realizado (edad en el análisis de los individuos seropositivos y seronegativos, edad y género en el análisis de los pacientes asintomáticos y sintomáticos). El género masculino se asoció con el desarrollo de CCC con un riesgo de 1,93 mientras que el género femenino evidenció protección con la disminución del riesgo en 0,51 (Tabla 7).

Tabla 7.

Características demográficas y clínicas de la población en estudio

<i>Variables</i>	<i>Seropositivos casos n=907 (60,5%)</i>	<i>Seronegativos controles =592 (39,5%)</i>	<i>P</i>	<i>OR (IC 95%)</i>
<i>Masculino</i>	405 (27,02%)	235 (15,67%)	0,058 ^a	1,22 (0,98 - 0,52)
<i>Femenino</i>	502 (33,49%)	357 (23,82%)	0,058 ^a	0,82 (0,65 - 1,01)
<i>Edad (Media ± DE)</i>	62 ± 16	55 ± 13	0,0000001 ^{b*}	NA
<i>Variables</i>	<i>Sintomáticos (CCC) casos n=542 (59,8%)</i>	<i>Asintomáticos controles n=365 (40,2%)</i>	<i>P</i>	<i>OR (IC 95%)</i>
<i>Masculino</i>	277 (30,54%)	128 (14,11%)	0,0000017 ^{a*}	1,93 (1,47-2,54)
<i>Femenino</i>	265 (29,22%)	237 (26,13%)	0,0000017 ^{a*}	0,51 (0,39 - 0,69)
<i>Edad (Media ± DE)</i>	67 ± 15	56 ± 16	0,0000001 ^{b*}	NA
<i>Fase II</i>	224 (24,68%)	-	NA	NA
<i>Fase III</i>	233 (25,69%)	-	NA	NA
<i>Fase IV</i>	85 (9,38%)	-	NA	NA

^aChi-cuadrado, ^bt-test, NA: No aplica, CCC: cardiomiopatía chagásica crónica, IC: intervalo de confianza, OR: odds ratio, DE: desviación estándar. *P<0,05.

9.1.2 Variables clínicas. El 40,2% de los pacientes con serología positiva se encontró en fase I de la ECh (pacientes asintomáticos). La distribución de los pacientes con CCC (sintomáticos) correspondió a 24,68% fase II, 25,69% fase III y 9,38% fase IV (Tabla 7).

9.1.3 Estructura poblacional. El coeficiente de Wright ($F_{ST} = 0,00051$) mostró que la población no está estructurada. Según Hartl & Clark (2007), los valores de F_{ST} por debajo de 0,05 son evidencia de poca estructura poblacional.

9.2 Análisis de asociación alélica y genotípica

Después de realizar el control de calidad de los datos obtenidos, de los 697 SPNs genotipados e imputados, se analizaron un total de 16 SNPs del gen *ANKRD1* y 242 SNPs del gen *MAP4K4*. Los 258 SNPs analizados se encontraron en equilibrio de Hardy-Weinberg (EHW) en todos los subgrupos analizados ($P > 0.01$).

Con el fin de evaluar la posible asociación de SNPs de los dos genes evaluados y la susceptibilidad a la infección con *T. cruzi*, se compararon las frecuencias alélicas y genotípicas de los individuos seronegativos y seropositivos. Las frecuencias alélicas de 3 SNPs del gen *ANKRD1* y 2 SNPs del gen *MAP4K4* fueron estadísticamente significativas. Con respecto a esto, los rs10047267, rs11595794 y rs10881853 del gen *ANKRD1* se asociaron con protección a la infección ($P=0,00037$, $OR=0,76$, $IC=0,65-0,89$; $P=0,00910$, $OR=0,68$, $IC=0,60-0,93$; $P=0,00910$, $OR=0,68$, $IC=0,60-0,93$, respectivamente). Analizando los resultados de los rs11595794 y rs11595794, se observó un alto desequilibrio de ligamiento (LD) con un valor de $r^2=1$, indicando que estos dos SNPs están completamente ligados y, en consecuencia, pueden considerarse como el mismo marcador en este estudio. Por el contrario, los rs2236935 y rs13400697 del gen *MAP4K4* se asociaron con riesgo a la infección ($P=0,00493$, $OR=1,35$, $IC=1,08-1,54$; $P=0,00493$, $OR=1,30$, $IC=1,07-1,46$; respectivamente) (Tabla 8).

SNP	MAF %	1 2	Gen	Grupo (n)	Frecuencias alélicas (%)		Test alélico		
					A1	A2	P	OR	IC 95%
rs10047267	41,53	G C	ANKRD1	Seronegativos (n=592)	543 (45,9)	641 (54,1)			
				Seropositivos (n=907)	702 (38,7)	1112 (61,3)	0,00037 ^a	0,76	0,65-0,89
rs11595794	11,97	A T	ANKRD1	Seronegativos (n=592)	165 (13,9)	1019 (86,1)			
				Seropositivos (n=907)	194 (10,7)	1620 (89,3)	0,00910 ^a	0,68	0,60-0,93
rs10881853	11,97	A G	ANKRD1	Seronegativos (n=592)	165 (13,9)	1019 (86,1)			
				Seropositivos (n=907)	194 (10,7)	1620 (89,3)	0,00910 ^a	0,68	0,60-0,93
rs2236935	20,15	C T	MAP4K4	Seronegativos (n=592)	205 (17,3)	979 (76,7)			
				Seropositivos (n=907)	399 (22,0)	1415 (78,0)	0,00493 ^a	1,35	1,08-1,54
rs13400697	34,59	G A	MAP4K4	Seronegativos (n=592)	373 (31,5)	811 (68,5)			
				Seropositivos (n=907)	664 (36,6)	1150 (63,4)	0,00411 ^a	1,30	1,07-1,46
rs17102362	15,55	G T	ANKRD1	Asintomáticos (n=365)	80 (10,9)	650 (89,1)			
				Sintomáticos (CCC) (n=542)	202 (18,6)	882 (81,4)	0,00021 ^b	1,73	1,33-2,25
rs11186367	14,55	C T	ANKRD1	Asintomáticos (n=365)	79 (10,8)	651 (89,2)			
				Sintomáticos (CCC) (n=542)	185 (17,1)	899 (82,9)	0,00174 ^b	1,63	1,24-2,14
rs2072206	11,58	C G	MAP4K4	Asintomáticos (n=365)	65 (8,9)	665 (91,1)			
				Sintomáticos (CCC) (n=542)	145 (13,4)	939 (86,6)	0,00781 ^b	1,53	1,11-2,10

Tabla 8. Análisis de frecuencias alélicas de SNPs en los genes *ANKRD1* y *MAP4K4* estadísticamente significativos en la población estudiada

^a valores P obtenidos por regresión logística usando la edad como covariable, ^b valores P obtenidos por regresión logística usando la edad y el sexo como covariables. CCC: cardiomiopatía chagásica crónica, MAF: frecuencia alélica menor, IC: intervalo de confianza, OR: odds ratio, A: alelo, SNP: polimorfismo de un solo nucleótido. *P<0,01.

Tabla 9.

Análisis de frecuencias genotípicas de SNPs en los genes ANKRD1 y MAP4K4 estadísticamente significativos en la población estudiada

SNP	Gen	Genotipos	Frecuencias genotípicas (%)			Test genotípico			Regresión logística		
			Seronegativos (n=592)	Seropositivos (n=907)	P ^a	OR	IC 95%	Módulo de herencia	P ^b	OR	IC 95%
rs10047267	ANKRD1	GG	130 (21.9)	150 (16.5)	0.0085*	0.70	0.54-0.92	Dominante	0.00056*	0.67	0.53-0.84
		GC	283 (47.8)	402 (44.3)	0.1859	0.86	0.70-1.07				
		CC	178 (30.3)	355 (39.2)	0.0004*	1.48	1.18-1.86				
rs11595794	ANKRD1	AA	14 (2.4)	14 (1.5)	0.2506	0.65	0.28-1.47	Dominante	0.00812*	0.76	0.59-0.97
		AT	137 (23.1)	166 (18.3)	0.0207	0.74	0.57-0.97				
		TT	441 (74.5)	727 (80.2)	0.0068*	1.38	1.07-1.78				
rs10881853	ANKRD1	AA	14 (2.4)	14 (1.5)	0.2508	0.65	0.28-1.47	Dominante	0.00812*	0.76	0.59-0.97
		AG	137 (23.1)	166 (18.3)	0.0207	0.74	0.57-0.97				
		GG	441 (74.5)	727 (80.2)	0.0068*	1.38	1.07-1.78				
rs2236835	MAP4K4	CC	18 (3.1)	81 (8.9)	0.00002*	3.13	1.83-5.59	Recesivo	0.00006*	3.43	2.01-5.86
		CT	169 (28.5)	237 (26.1)	0.3033	0.88	0.69-1.12				
		TT	405 (68.4)	589 (65.0)	0.1643	0.85	0.68-1.07				
rs13400697	MAP4K4	GG	59 (9.9)	130 (14.3)	0.0069*	1.51	1.08-2.13	Recesivo	0.0094*	1.48	1.06-2.09
		GA	255 (43.1)	404 (44.5)	0.5756	1.06	0.86-1.32				
		AA	278 (47.0)	373 (41.2)	0.0259	0.78	0.64-0.98				
SNP	Gen	Genotipos	Frecuencias genotípicas (%)			Test genotípico			Regresión logística		
			Asintomáticos (n=365)	Sintomáticos (CCC) (n=542)	P ^a	OR	IC 95%	Módulo de herencia	P ^b	OR	IC 95%
rs17102362	ANKRD1	GG	9 (2.5)	31 (5.7)	0.0183	2.39	1.08-5.78	Dominante	0.00079*	1.79	1.27-2.51
		GT	62 (17.0)	140 (25.8)	0.0017*	1.70	1.21-2.42				
		TT	284 (80.5)	371 (68.45)	0.0001*	0.52	0.38-0.73				
rs1186367	ANKRD1	CC	7 (1.9)	23 (4.2)	0.0548	2.27	0.92-6.31	Dominante	0.00493*	1.74	1.26-2.38
		CT	65 (17.8)	139 (25.6)	0.0056*	1.59	1.13-2.25				
		TT	293 (80.3)	380 (70.2)	0.0006*	0.58	0.41-0.79				
rs2072206	MAP4K4	CC	6 (1.6)	21 (3.9)	0.0526	2.41	0.92-7.37	Dominante	0.00971*	1.56	1.07-2.26
		CG	53 (14.5)	103 (19.0)	0.0763	1.38	0.94-2.02				
		GG	306 (83.9)	418 (77.1)	0.0135	0.65	0.45-0.93				

^a valores P obtenidos por Chi cuadrado. ^b valores P obtenidos por regresión logística bajo los modelos dominante y recesivo usando la edad como covariable, ^c valores P obtenidos por regresión logística bajo los modelos dominante y recesivo usando la edad y el género como covariables. CCC: cardiomiopatía chagásica crónica, IC: intervalo de confianza, OR: odds ratio, SNP: polimorfismo de un solo nucleótido. *P<0,01.

En cuanto a las frecuencias genotípicas de los alelos polimórficos, el genotipo GG del rs10047267 (gen *ANKRD1*) se asoció con protección a la infección (P=0,0085, OR=0,70, IC=0,54-0,92), mientras que el genotipo CC del rs2236935 y el genotipo GG del rs13400697 (gen *MAP4K4*) se asociaron con riesgo a la infección (P=0,00002, OR=3,13, IC=1,83-5,59; P=0,0089, OR=1,51, IC=1,08-2,13; respectivamente) (Tabla 9).

El análisis de regresión logística bajo la hipótesis de un modelo dominante, dio como resultado que una sola copia del alelo polimórfico es suficiente para otorgar protección a la infección en los rs10047267, rs11595794 y rs10881853 del gen *ANKRD1* (P=0,00056, OR=0,67, IC=0,53-0,84; P=0,00812, OR=0,76, IC=0,59-0,97; P=0,00812, OR=0,76, IC=0,59-0,97, respectivamente). En contraste, el análisis suponiendo un modelo recesivo, mostró que dos copias del alelo polimórfico en los rs2236935 y rs13400697 del gen *MAP4K4* aumentan el riesgo de infección (P=0,00006, OR=3,43, IC=2,01-5,86; P=0,0094, OR=1,49, IC=1,06-2,09; respectivamente) (Tabla 9).

A continuación, para evaluar la posible asociación entre SNPs de los genes seleccionados y la CCC, se compararon las frecuencias alélicas y genotípicas de los pacientes seropositivos asintomáticos y los pacientes con CCC (síntomáticos). La distribución de las frecuencias alélicas de los rs17102362, rs11186367 (*ANKRD1*) y rs2072206 (*MAP4K4*) se asociaron con riesgo de desarrollar CCC (P=0,00021, OR=1,73, IC=1,33-2,25; P=0,00174, OR=1,63, IC=1,24-2,14;

$P=0,00781$; $OR=1,53$; $IC=1,11-2,10$; respectivamente) (Tabla 8). Los genotipos GT, del rs17102362 y CT del rs11186367, se observaron con mayor frecuencia en pacientes sintomáticos que en asintomáticos y se asociaron a riesgo ($P=0,0017$, $OR=1,70$, $IC=1,21-2,42$; $P=0,0056$, $OR=1,59$, $IC=1,13-2,25$; respectivamente). Bajo un modelo de herencia dominante se observó que para los tres SNPs estadísticamente significativos (rs17102362, rs11186367 (*ANKRD1*) y rs2072206 (*MAP4K4*)), una sola copia del alelo polimórfico confiere susceptibilidad a desarrollar CCC ($P=0,00079$, $OR=1,79$, $IC=1,27-2,51$; $P=0,00493$, $OR=1,74$, $IC=1,26-2,38$; $P=0,00971$, $OR=1,56$, $IC=1,07-2,26$; respectivamente) (tabla 9).

Finalmente, para indagar la posible asociación de las variantes analizadas con la severidad y progresión de la CCC, se agruparon los pacientes en fase III y IV de la enfermedad y se compararon con los pacientes en fase II. Sin embargo, no se observaron diferencias estadísticamente significativas.

9.3 Análisis de Haplotipos

Además del estudio de asociación de cada sitio polimórfico en particular, se realizó un análisis de haplotipos para los dos genes seleccionados. En el análisis del gen *ANKRD1* entre los individuos seropositivos y seronegativos mostró que el haplotipo ACAA (rs10881853, rs13791472, rs11595794, rs11595794s56177217) con una frecuencia de 10.9% en los casos y 13.9% en los controles, se asoció con protección a la infección ($P=0,0053$, $OR=0,73$, $CI=0,55-0,97$). Por otra parte, el análisis entre los pacientes seropositivos asintomáticos y con CCC (sintomáticos) mostró que el haplotipo TGCAG (rs3939, rs17102362, rs11186367, rs190839223, rs15027574) con una frecuencia de 17% en los casos y 7,6% en los controles, se asoció con riesgo al desarrollo de CCC

($P=0,0005$, $OR=2,49$, $IC=1,85-3,36$) (Tabla 10). En relación con el análisis de haplotipos del gen *MAP4K4* entre los individuos seropositivos y seronegativos y los pacientes seropositivos asintomáticos y con CCC (síntomáticos), no se observaron diferencias estadísticamente significativas.

9.4 Poder estadístico del estudio

El poder estadístico del estudio se calculó teniendo como referencia la prevalencia de la enfermedad de Chagas en Colombia reportada por Olivera *et al.*, 2019 (2%), un rango de frecuencias del alelo menor (MAF) ente 10% y 30%, un rango de ORs comprendido entre 1,25 – 2,0 y un nivel de significancia del 1% (Tabla 11).

Tabla 10.

Análisis de haplotipos del gen ANKRD1

Haplotipo	Frecuencia	SNP	Gen	Bloque	Frecuencia		P ^a	OR	IC 95%
					Seronegativos (n=592)	Seropositivos (n=907)			
GCTGG	49,4%	rs10881853	ANKRD1	2	47,0%	51,0%	0,0308	1,17	0,98-1,40
GCTAA	29,6%	rs137914723			29,9%	29,4%	0,7601	0,97	0,80-1,18
ACAAA	11,9%	rs11595794			13,9%	10,6%	0,0052*	0,73	0,55-0,97
GTTAA	5,3%	rs200503746			5,4%	5,3%	0,8386	0,98	0,65-1,47
GCTAG	3,4%	rs56177217			3,3%	3,4%	0,927	1,03	0,61-1,73
Haplotipo	Frecuencia	SNP	Gen	Bloque	Frecuencia		P ^a	OR	IC 95%
					Asintomáticos (n=365)	Síntomáticos (CCC) (n=542)			
CTTAG	46,3%	rs3939	ANKRD1	1	48,9	44,6%	0,0751	0,84	0,70-1,01
TTTAG	36,9%	rs17102362			38,6%	36,0%	0,0593	0,89	0,74-1,07
TGCAG	10,7%	rs11186367			7,6%	17,0%	0,0005*	2,49	1,85-3,36
TGCAA	2,6%	rs190839223			2,1%	2,6%	0,3227	1,24	0,66-2,34
CTTGG	1,4%	rs150275749			1,2%	1,6%	0,5647	1,33	0,59-3,11

^a valores P obtenidos por regresión logística, CCC: cardiomiopatía chagásica crónica, IC: intervalo de confianza, OR: odds ratio, SNP: polimorfismo de un solo nucleótido. * $P<0,01$.

Tabla 11.

Cálculo del poder estadístico considerando diferentes tamaños de efecto

<i>Cálculo del poder estadístico - infección con T. cruzi (907/592)*</i>					
<i>MAF</i>	<i>10%</i>	<i>15%</i>	<i>20%</i>	<i>25%</i>	<i>30%</i>
OR= 1,25	25,9%	38,4%	48,4%	56,0%	61,4%
OR= 1,50	86,0%	95,7%	98,5%	99,4%	99,7%
OR= 2,0	100%	100%	100%	100%	100%
<i>Cálculo del poder estadístico - desarrollo de la CCC (542/365) **</i>					
<i>MAF</i>	<i>10%</i>	<i>15%</i>	<i>20%</i>	<i>25%</i>	<i>30%</i>
OR= 1,25	14,1%	21,1%	27,2%	33,2%	36,3%
OR= 1,50	60,4%	77,6%	86,7%	91,4%	93,9%
OR= 2,0	99,5%	100%	100%	100%	100%

*El análisis fue realizado con 907 individuos seropositivos (casos) y 592 individuos seronegativos (controles). **El análisis fue realizado con 542 pacientes con CCC (casos) y 365 pacientes seropositivos asintomáticos (controles).

10. Discusión

La etiología de la ECh se considera de carácter complejo o multifactorial donde la interacción de genes del hospedero, factores ambientales y la diversidad biológica del parásito pueden jugar un papel importante en la manifestación de la enfermedad. En este sentido, la variabilidad genética del hospedero ha demostrado una fuerte evidencia científica de su relación con la susceptibilidad y el desarrollo de las formas crónicas y severas de la enfermedad. En diferentes estudios, se han propuesto enfoques genéticos cualitativos y dicotómicos comparando individuos seropositivos y

seronegativos para antígenos contra *T. cruzi* (ambos grupos de individuos expuestos a la infección) o la presencia o ausencia de CCC y/o manifestación digestiva. Varios SNPs en genes involucrados en la respuesta inmune e inflamatoria han demostrado su asociación o no con los desenlaces de la enfermedad. Sin embargo, todavía el número de genes asociados es limitado y se desconocen los mecanismos fisiopatológicos subyacentes a esta afección tan importante en América Latina (Vasconcelos *et al.*, 2012; Ayo *et al.*, 2013; Shaw, 2017; Acosta-Herrera *et al.*, 2019).

Es importante mencionar que, en el caso de enfermedades complejas y multifactoriales como es el caso de la ECh, la identificación de genes relacionados con la susceptibilidad, desarrollo y severidad de la patología es difícil, por el hecho de que una variante no determina por si sola su participación con la presentación de la enfermedad, sino podría estar haciendo un aporte modesto a la misma.

Otro aspecto importante para tener en cuenta en los estudios de asociación genética es el diseño del estudio. En nuestro caso, se realizó un estudio poblacional con el diseño de casos y controles, siendo importante determinar que la población en estudio no esté estructurada o presente concentración de grupos étnicos para evitar obtener resultados falsos positivos. En nuestro estudio la población no mostró estructuración, presentando un F_{ST} de 0.00051 que demuestra que los individuos que participaron pertenecen a una misma unidad genética poblacional.

Otro factor relevante para considerar en este tipo de estudios es la adecuada selección de los controles, en este sentido en nuestro estudio se seleccionaron individuos de la misma zona geográfica, con el objetivo de asegurar condiciones socioeconómicas (tipo de vivienda) similares y con iguales condiciones ambientales, especialmente aquellas relacionadas con exposición al vector y alta probabilidad de infección o re-infección. Todos los individuos seropositivos en nuestro estudio fueron evaluados clínicamente y se les realizaron pruebas electrocardiográficas

para ser clasificados con precisión, las cuales fueron evaluadas por el mismo cardiólogo con parámetros iguales. Además, variables de confusión como la edad y el sexo fueron tenidas en cuenta en el análisis por regresión logística realizado en nuestro estudio. El poder estadístico de todas las asociaciones encontradas en nuestro estudio fue mayor a un 80%.

En el presente trabajo se seleccionaron dos genes candidatos, *ANKRD1* y *MAP4K4*, por presentar expresión diferencial en células mononucleares de pacientes con CCC y asintomáticos, además, de participar en vías de señalización importantes que regulan la respuesta inmune e inflamación crónica, mecanismos involucrados y relevantes en el transcurso de la ECh y su papel en otras patologías cardíacas.

Gen *ANKRD1*

Como se mencionó previamente, el gen *ANKRD1*, codifica para la proteína ANKR1, una proteína pleiotrópica que contiene cuatro dominios de repetición de anquirina, una señal de localización nuclear, una secuencia rica en prolina, ácido glutámico, serina y treonina, y múltiples sitios de fosforilación (Ling *et al.*, 2017). Esta proteína se describe como una proteína de unión a ADN nuclear inducida por citoquinas inflamatorias (IL-1 β y TNF- α) en células endoteliales dérmicas y en mioblastos humanos (Chu *et al.*, 1995; Liu *et al.*, 2015). Posteriormente, se encontró que *ANKR1* se expresa abundantemente en miocitos cardíacos y musculo esquelético, donde se ubica en la banda I del sarcómero a través de la unión a la titina, miopalladina y calsecuestrina 2 (Miller *et al.*, 2001; Bang *et al.*, 2003; Ling *et al.*, 2017).

Como se describió en la sección de resultados los SNPs rs10047267, rs11595794 y rs10881853 del gen *ANKRD1* mostraron asociación con protección a la infección. Por el contrario, los SNPs rs17103362 y rs111863 mostraron asociación con riesgo al desarrollo de CCC (Tablas 8). Cabe aclarar, que estos SNPs se ubican en regiones intrónicas de este gen.

En el caso del alelo G del SNP rs10047267 y el alelo A de los SNPs rs11595794 y rs10881853 encontrados con mayor frecuencia en el grupo de individuos seronegativos, éstos podrían llevar a una producción aumentada de la proteína ANKR1, la cual generaría una retroalimentación positiva en la producción de citoquinas proinflamatorias importantes en la eliminación eficiente del parásito en la fase aguda de la enfermedad (IFN- γ , TNF- α e IL-1 β), explicando así su asociación protectora encontrada en nuestro estudio.

Adicional a la asociación alélica, encontramos que haplotipos generados con polimorfismos del gen *ANKRD1*, se asociaron también con protección a la infección y desarrollo de CCC. El haplotipo ACAA conformado por los SNPs rs10881853, rs10881853, rs11595794, rs200503746 y rs56177217 mostró asociación con protección a la infección de *T. cruzi*. La presencia en el haplotipo de dos de los alelos encontrados con asociación corrobora lo encontrado en el análisis de las frecuencias alélicas y es relevante e interesante porque estaría apoyando la importancia de estos polimorfismos y este gen con la enfermedad. El papel protector de estos polimorfismos a la infección estaría soportado por el papel descrito del gen *ANKRD1* en modelos de infecciones virales.

Kaczowski y colaboradores, encontraron que el gen *ANKRD1* estaba regulado positivamente por los genotipos 11, 16 y 45 del virus del papiloma humano (VPH) en una línea celular de queratinocitos (Kaczowski *et al.*, 2012). Than y colaboradores, mostraron que el gen *ANKRD1* fue expresado significativamente en un modelo de infección con el virus de la hepatitis C (VHC) en hepatocitos (Than *et al.*, 2016). Aunque estos estudios no abordaron la función biológica de este gen, sugirieron que *ANKRD1* actúa como un sensor de peligro (Lianghua *et al.*, 2018).

Otro estudio, describió que el gen *ANKRD1* regula la respuesta inmune innata en células mononucleares de sangre periférica infectadas con el virus del herpes simple 1 (VHS-1). Lianghua

y colaboradores, realizando experimentos con células presentadoras de antígenos infectadas con el VHS-1, demostraron que el silenciamiento de este gen condujo a un aumento de la carga viral y una producción reducida de IFN- γ . Además, encontraron que la expresión del gen *ANKRD1* en células mononucleares podría estar incrementada por la producción de citoquinas inducidas en el proceso de infección como el IFN- α , IFN- γ , TNF- α e IL-1 β , pero no por IL-29, IL-4 e IL-22. Asimismo, utilizando anticuerpos neutralizantes para bloquear la actividad de estas citoquinas (anti-IFN- α , anti-IFN- γ , anti-IL-1 β y anti-TNFR1), evidenciaron que el gen *ANKRD1* disminuyó significativamente su expresión durante la estimulación de los receptores TLR-9 y TLR-7 (Lianghua et al., 2018).

Sin embargo, aunque la producción de estas citoquinas ayuda a controlar de una manera eficiente la parasitemia, los niveles excesivos pueden causar daño tisular e incluso la muerte en la fase aguda y crónica de la enfermedad. Múltiples hallazgos sugieren que el IFN- γ y el TNF- α juegan un papel patogénico central en la miocarditis y la insuficiencia cardíaca en pacientes con CCC (Levick *et al.*, 2014; Ferreira *et al.*, 2017; Chevillard *et al.*, 2018). Esto ayudaría a explicar los resultados obtenidos en los cuales, el alelo G del rs17103362 y el alelo C del rs111863 fueron encontrados con mayor frecuencia en pacientes sintomáticos para la CCC, los cuales podrían estar llevando a un aumento en la producción de esta proteína y de las citoquinas inflamatorias, contribuyendo así al desarrollo de la CCC. Al igual que en el análisis de pacientes seronegativos y seropositivos el haplotipo TGCAG formado por los SNPs (rs3939, rs17102362, rs11186367, rs190839223 y rs150275749) asociado con riesgo al desarrollo de CCC, también incluye los alelos identificados como de riesgo.

La importancia del gen *ANKRD1* como factor de riesgo a CCC estaría soportado en diferentes estudios en los que se ha encontrado que una mayor expresión del gen exacerba la hipertrofia,

induce fibrosis cardíaca y aumenta la apoptosis de cardiomiocitos (Ling *et al.*, 2017), características principales de la CCC. Entre ellos encontramos uno en el que se ha reportado que el gen *ANKRD1* aumenta su expresión en animales y humanos con hipertrofia (Aihara *et al.*, 2000; Gaussin *et al.*, 2003) e insuficiencia cardíaca (Nagueh *et al.*, 2004; Wei *et al.*, 2009). En respuesta al estrés hipertrófico, la sobrecarga de presión y el estrés mecánico en cardiomiocitos, la expresión de *ANKRD1* aumenta y exacerba el remodelado cardíaco a través de la activación de la vía de la calcineurina/factor nuclear de células T activadas (NFAT), una vía de señalización que juega un papel importante en la expresión de genes involucrados en la hipertrofia cardíaca (Chen *et al.*, 2014). Por otro lado, la expresión del gen *ANKRD1* se incrementa en ratones *knockout* (KO) para el Inhibidor del activador del plasminógeno tipo 1 (PAI-1), que a su vez induce la elevación del gen de respuesta de crecimiento temprano 1 (*Egr1*) el cual está asociado con fibrosis cardíaca. Además, la regulación positiva concomitante de varios genes implicados en las respuestas pro-fibróticas, incluido *ANKRD1*, también conduce al desarrollo de fibrosis cardíaca (Samaras *et al.*, 2015). En la apoptosis se ha reportado que corazones estimulados con angiotensina II, inducidos a sobrecarga de presión o en modelos murinos de insuficiencia cardíaca, la sobreexpresión de *ANKRD1* y de p53 conduce a un aumento de la apoptosis de cardiomiocitos (Shen *et al.*, 2015).

Asimismo, se ha demostrado que la expresión del gen *ANKRD1* se correlaciona positivamente con los niveles de péptido natriurético pro-auricular (proANP) y péptido natriurético cerebral (BNP) en corazones de animales y humanos con daño cardíaco, lo que sugiere que la expresión de este gen puede estar mediada a través de vías reguladoras comunes. Tanto pro-ANP como BNP son péptidos natriuréticos bien aceptados por su valor diagnóstico como marcadores de

insuficiencia cardíaca, lo que señala el potencial de este gen como una señal útil de la aparición y progresión de la insuficiencia cardíaca (Bogomolovas et al., 2015), característica de la CCC.

Gen *MAP4K4*

Como fue mencionado previamente, el gen *MAP4K4* codifica para la proteína M4K4, una serina/treonina quinasa involucrada en una amplia gama de procesos fisiológicos que incluyen migración, proliferación y adhesión celular, además, su actividad se ha implicado en inflamación sistémica, trastornos metabólicos, enfermedad cardiovascular y cáncer (Chuang et al., 2016).

En nuestro estudio los SNPs rs2236935 y rs13400697 del gen *MAP4K4* se asociaron con riesgo a la infección y el rs2072206 se asoció con riesgo a desarrollar CCC (Tabla 8). Igualmente, estos SNPs están ubicados en regiones intrónicas. Diferentes estudios nos permitirían explicar el riesgo a la infección asociado con polimorfismos de este gen.

Aouadi y colaboradores, describieron que el gen *MAP4K4* juega un papel importante en la regulación de la respuesta inmune innata. El silenciamiento de *MAP4K4* mediante un siRNA en macrófagos de rata, mostró que la producción de TNF- α e IL-1 β se inhibió tras la estimulación con lipopolisacárido (LPS) (Aouadi et al., 2009). Otro estudio, también evidenció la regulación negativa del TNF- α por parte del gen *MAP4K4* en células Jurkat (linfocitos T) estimuladas con células presentadoras de antígeno retadas con toxinas de *Staphylococcus aureus* (Mack et al., 2005).

Huang y colaboradores, demostraron en experimentos *in-vitro* que la delección del gen *MAP4K4* en linfocitos T CD4⁺ suprimió notablemente su proliferación en respuesta al forbol 12-miristato 13-acetato (PMA) y la ionomicina producida por *Streptomyces conglobatus*, además, observaron una reducción significativa en la producción de IFN- γ , TNF- α e IL-2 (Huang et al., 2014). De esta manera, estos resultados evidencian que citoquinas importantes en la neutralización

de *T. cruzi* podrían estar reguladas negativamente por la expresión del gen *MAP4K4*, lo que podría aumentar el riesgo de susceptibilidad a la infección con el parásito como lo mostraron nuestros resultados.

Por otra parte, el riesgo al desarrollo de la CCC identificado en este estudio, estaría soportado por estudios en los que se ha demostrado que las proteínas quinasas juegan un rol importante en la muerte celular de cardiomiocitos y progresión de enfermedad cardíaca (Zohn *et al.*, 2006; Rose *et al.*, 2010; Marber *et al.*, 2011). La señalización de las MAP quinasas implica eventos de fosforilación y desfosforilación en una cascada de quinasas que abarca cuatro etapas: MAP4K-MAP3K-MAP2K-MAPK. Las MAP quinasas cumplen funciones importantes en la progresión de falla cardíaca en diferentes tipos de cardiomiopatías e infarto del miocardio. Se ha sugerido que la vía M4K4 (MAP4K) – TAK1 (MAP3K) – JNK y p38 (MAPK), juega un papel relevante en la muerte celular miocárdica, desarrollo de insuficiencia y falla cardíaca. Esta vía molecular activa quinasas importantes en la hipertrofia, falla cardíaca (proteína quinasa C/PKC α , β , ϵ , λ y ζ ; proteína quinasa activada por AMP/AMPK) y proteína quinasa D/PKD) y agonistas de muerte celular miocárdica (calcio-calmodulina quinasa II/CaMKII , proteína quinasa 1 que contiene bobinas en espiral asociadas con rho/ROCK1) , proteína quinasa tipo C delta/PKC- δ) y proteína quinasa C-theta/PKC- θ) (Hallows *et al.*, 2010; Sin & Baillie 2012; Fiedler *et al.*, 2014). El alelo C del rs2072206 observado con mayor frecuencia en pacientes sintomáticos con CCC, podría estar relacionado con el aumento de la transcripción y traducción de este gen y la activación de esta vía, explicando el desarrollo de la CCC.

En cuanto al papel de *MAP4K4* en la muerte de cardiomiocitos y desarrollo de enfermedades cardíacas, se ha demostrado que se expresa en niveles elevados y significativos en corazones humanos con cardiomiopatía dilatada, cardiomiopatía hipertrófica o enfermedad isquémica,

además, su expresión concomitante con la caspasa-3, un mediador de la apoptosis y la activación de su intermediario TAK1 (MAP3K) que también puede conducir a la muerte celular cardíaca (Fiedler et al., 2019). En modelos murinos y cardiomiocitos de rata cultivados, el gen *MAP4K4* se activa por provocaciones clínicamente relevantes que promueven la muerte celular del músculo cardíaco, incluyendo la lesión por isquemia reperusión y estrés oxidativo, procesos patobiológicos de trastornos cardíacos agudos y crónicos (Bertero y Maack, 2018). En cardiomiocitos derivados de células madre pluripotentes inducidas en humanos (hiPSC-CMs), el silenciamiento de este gen por un shRNA y su inhibición farmacológica demostró una reducción significativa en la muerte celular después de ser sometidos a estrés oxidativo, implicando a *MAP4K4* como un objetivo principal para suprimir la muerte de células cardíacas humanas y evitar la progresión de falla e insuficiencia cardíaca (Fiedler et al., 2019).

Hasta el momento no existen reportes de estudios de asociación de variantes genéticas (SNPs) en los genes *ANKRD1* y *MAP4K4* en ECh, ni tampoco otros estudios con las proteínas codificadas por estos dos genes, siendo este el primer hallazgo de su posible papel en la susceptibilidad a la infección y desarrollo de CCC.

Para poder determinar de manera precisa el papel de los polimorfismos encontrados en nuestro estudio y con el fin de dilucidar los mecanismos de acción de estos dos genes en la ECh, se hace necesario adelantar estudios funcionales que permitan determinar si éstos regulan o no la expresión de estos genes o participan en la estabilidad de su RNAm. Igualmente, sería importante realizar estudios de replicación en otras poblaciones endémicas y adelantar estudios de rastreo del genoma. En este sentido, nuestro grupo de investigación adelanta un estudio de GWAS en individuos colombianos, el cual esperamos en un futuro cercano revele información estadísticamente

significativa a nivel genómico y nos permita entender de una mejor manera las bases genéticas de la ECh.

11. Conclusiones

Este trabajo evidenció por primera vez que 5 SNPs del gen *ANKRD1* y 3 SNPs del gen *MAP4K4* ubicados en regiones intrónicas, están asociados con la ECh en una población colombiana. Los rs10047267, rs11595794 y rs10881853 del gen *ANKRD1* mostraron asociación con protección a la infección, mientras que los rs2236935 y rs13400697 del gen *MAP4K4* se asociaron con riesgo a la infección. Por otra parte, los rs17102362 y rs11186367 del gen *ANKRD1* y el rs2072206 del gen *MAP4K4* estuvieron asociados con el desarrollo de CCC.

En el análisis de las frecuencias genotípicas, los SNPs rs10047267, rs11595794, rs10881853, rs17102362, rs11186367 y rs2072206 se ajustaron bajo un modelo de herencia dominante, mientras que los SNPs rs2236935 y rs13400697 se ajustaron bajo un modelo de herencia recesivo.

En el análisis de desequilibrio de ligamiento en el gen *ANKRD1* se identificaron dos haplotipos que mostraron patrones sugestivos de protección a la infección con *T. cruzi* y desarrollo de CCC. El análisis de haplotipos en el gen *MAP4K4*, no mostró resultados estadísticamente significativos.

El haplotipo ACAA generados por los SNPs rs10881853, rs10881853, rs11595794, rs200503746 y rs56177217 mostró asociación con protección a la infección de *T. cruzi*, mientras que el haplotipo TGCAG formado por los SNPs rs3939 rs17102362 rs11186367 rs190839223

rs150275749 se asoció con riesgo al desarrollo de CCC, corroborando lo encontrado en el análisis de las frecuencias alélicas.

Las frecuencias alélicas y genotípicas en los pacientes en fase III y IV, versus los pacientes en fase II de la CCC no mostraron asociaciones estadísticamente significativas con progresión o severidad de la enfermedad.

12. Recomendaciones

Realizar estudios funcionales de las variantes genéticas asociadas para evidenciar cómo estos SNPs afectan la expresión o función de la proteína y definir la forma como estarían involucradas en la patogénesis de la ECh.

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

Aumentar el número de pacientes en las diferentes fases de la CCC (fase II, III y IV) para determinar asociaciones significativas con la progresión y severidad de la enfermedad.

Realizar estudios de replicación en otras poblaciones endémicas de la ECh para corroborar los resultados obtenidos en nuestro estudio.

Adelantar en la misma población, estudios de seguimiento para definir el valor pronóstico de los polimorfismos encontrados en nuestro estudio.

Referencias Bibliográficas

- Acosta-Herrera M, Strauss M, Casares-Marfil D, Martín J. (2019) Genomic medicine in Chagas disease. *Acta Tropica*. Jun 12; 197:105062.
- Aihara Y, Kurabayashi M, Saito Y, Ohyama Y, Tanaka T, *et al.* (2000) Cardiac ankyrin repeat protein is a novel marker of cardiac hypertrophy: role of M-CAT element within the promoter. *Hypertension*.; 36: 48–53.
- Almodovar-Garcia K., Kwon M., Samaras S.E., Davidson J.M. (2014) ANKRD1 acts as a transcriptional repressor of *MMP13* via the AP-1 site. *Mol. Cell. Biol.* ; 34:1500–1511.
- Andrade JP, Marin Neto JA, Paola AA, Vilas-Boas F, Oliveira GM, Bacal F, *et al.* (2011) Latin American Guidelines for the diagnosis and treatment of Chagas' heart disease: executive summary. *Arquivos brasileiros de cardiologia*. jun;96(6):434-42.
- Andrade L., Andrews N. (2005) The Trypanosoma cruzi–host-cell interplay: location, invasion, retention. *Nature Reviews Microbiology*, vol. 3, no 10, p. 819-823.
- Andreasen C., Nielsen J.B., Refsgaard L., Holst A.G., Christensen A.H., Andreasen L., *et al.* (2013) New population-based exome data are questioning the pathogenicity of previously cardiomyopathy-associated genetic variants. *European journal of human genetics*. 21(9), 918-928 Aouadi, M., Tesz, G. J., Nicoloso, S. M., Wang, M., Chouinard, M., Soto, E., *et al.*).
- Arama, C., *et al.* (2015) Ethnic differences in susceptibility to malaria: what have we learned from immuno-epidemiological studies in West Africa? *Acta Trop.*; 146,152–156.
- Arimura T., Bos J.M., Sato, A., Kubo T., Okamoto H., Nishi H. *et al.* (2009) Cardiac ankyrin repeat protein gene (ANKRD1) mutations in hypertrophic cardiomyopathy. *J. Am. Coll. Cardiol.*, 54, 334–342

- Ayo C.M., et al. (2013) Genetic susceptibility to Chagas disease: an overview about the infection and about the association between disease and the immune response genes. *BioMed Research International*, , 1–13.
- Balouz V., Agüero F., Buscaglia CA. (2017) Chagas Disease Diagnostic Applications: Present Knowledge and Future Steps. *Advance Parasitology*. ;97:1-45.
- Bang ML, Mudry RE, McElhinny AS, Trombitas K, Geach AJ, Yamasaki R, *et al.* (2001) Myopalladin, a novel 145-kilodalton sarcomeric protein with multiple roles in Z-disc and I-band protein assemblies. *J Cell Biol.* ; 153:413–27.
- Barcán L, et al. (2005) Transmission of *T. cruzi* infection via liver transplantation to a nonreactive recipient for Chagas' disease. *Liver Transplantation*, , vol. 11, no 9, p. 1112-1116.
- Barrett JC, Fry B, Maller J, Daly MJ. (2005) Haploview: analysis and visualization of LD and haplotype maps. *Bioinformatics*; 21(2):263-5.
- Bermudez J. et al. (2016) Current drug therapy and pharmaceutical challenges for Chagas disease. *Acta Tropica*, vol. 156, p. 1-16.
- Bern C. (2015) Chagas' Disease. *The New England journal of medicine*. Nov 5;373(19):1882.
- Bern C. et al. (2011) *Trypanosoma cruzi* and Chagas' disease in the United States. *Clinical Microbiology Reviews*, , vol. 24, no 4, p. 655-681.
- Bertero E., Maack C. (2018) Calcium signaling and reactive oxygen species in mitochondria. *Circ. Res.* ; 122:1460–1478.
- Blackwell JM, Jamieson SE, Burgner D. (2009) HLA and infectious diseases. *Clin Microbiol Rev.*;22(2):370-85, Table of Contents.
- Bochud M. (2012) Genetics for clinicians: from candidate genes to whole genome scans (technological advances). *Best Pract Res Clin Endocrinol Metab.*;26(2):119-32.

- Bogomolovas J., Brohm K., Celutkienė J., Balciunaite G., Bironaite D., Bukelskiene V. et al. (2015) Induction of ANKRD1 in dilated cardiomyopathy correlates with the heart failure progression. *BioMed Res. Int.* 273936.
- Bonney KM., Luthringer DJ., Kim SA., Garg NJ. y Engman DM. (2017) Pathology and Pathogenesis of Chagas Heart Disease. *Annual Review of Pathology: Mechanisms of Disease*, , 14(1), p 419-445.
- Brener, Zigman. (1973) Biology of *Trypanosoma cruzi*. *Annual Reviews in Microbiology*, vol. 27, no 1, p. 347-382
- Bush WS, Moore JH. (2012) Chapter 11: Genome-wide association studies. *PLoS Comput Biol.*;8(12):e1002822.
- Campos MA y Gazzinelli RT. (2004) *Trypanosoma cruzi* and its components as exogenous mediators of inflammation recognized through Toll-like receptors. *Mediat. Inflamm*; 13:139–43
- Cestari I., Ramirez M. (2010) Inefficient complement system clearance of *Trypanosoma cruzi* metacyclic trypomastigotes enables resistant strains to invade eukaryotic cells. *Plos One*, , vol. 5, no 3, p. e9721.
- Chapman SJ, Hill AV. (2012) Human genetic susceptibility to infectious disease. *Nat Rev Genet*; 13(3):175-88.
- Chaussabel D., Pajak B., Vercruysse V., Bisseyé C., Garze V., Habib M. et al. (2003) Alteration of migration and maturation of dendritic cells and T-cell depletion in the course of experimental *Trypanosoma cruzi* infection. *Laboratory Investigation*; 83 (9): 1373-82.
- Chen C., Shen L., Cao S., Li X., Xuan W., Zhang J., Huang X., Bin J., Xu D., Li G., et al. (2014) Cytosolic CARP promotes angiotensin II- or pressure overload-induced cardiomyocyte hypertrophy through calcineurin accumulation. *PLoS ONE*. ;9: e104040.
- Chevillard C, Nunes JPS, Frade AF, Almeida RR, Pandey RP, Nascimento MS, Kalil J and Cunha-Neto E. (2018) Disease Tolerance and Pathogen Resistance Genes May Underlie *Trypanosoma cruzi* Persistence and Differential Progression to Chagas Disease Cardiomyopathy. *Frontiers and Immunology*; 9:2791.

- Chu W, Burns DK, Swerlick RA, Presky DH. (1995) Identification and characterization of a novel cytokine-inducible nuclear protein from human endothelial cells. *J Biol Chem.*; 270:10236–45.
- Chuang HC, Wang X, Tan TH. (2016) MAP4K family kinases in immunity and inflammation. *Adv Immunol.*; 129:277–314.
- Clay GM., Sutterwala FS., Wilson ME. (2014) NLR proteins and parasitic disease. *Immunol. Res.*; 59:142–52 53.
- Consortium, Leish G.E.N., et al. (2013) Common variants in the HLA-DRB1-HLA-DQA1HLA class II region are associated with susceptibility to visceral leishmaniasis. *Nat.Genet.*;45 (2), 208–213.
- Criado L, Florez O, Martin J, Gonzalez CI. (2012) Genetic polymorphisms in TNFA/TNFR2 genes and Chagas disease in a Colombian endemic population. *Cytokine. Mar*;57(3):398-401.
- Cucunubá ZM., Nouvellet P., Conteh L., Vera MJ., Angulo VM., Dib JC. *et al.* (2017) Modelling historical changes in the force-of-infection of Chagas disease to inform control and elimination programmes: application in Colombia. *BMJ Glob Health.*; 2:e000345.
- Cunha-Neto E, Dzau VJ, Allen PD et al. (2005) Cardiac gene expression profiling provides evidence for cytokinopathy as a molecular mechanism in Chagas' disease cardiomyopathy. *Am J Pathol*; 167:305–13.
- Cunha-Neto E., Chevillard C. (2014) Chagas disease cardiomyopathy: immunopathology and genetics. *Mediators of Inflammation*, vol. 2014.
- Da Matta Guedes PM., Gutierrez FR., Maia Fl., Milanezi CM., Silva GK., (2010) Pavanelli WR. IL-17 produced during *Trypanosoma cruzi* infection plays a central role in regulating parasite-induced myocarditis. *PLoS Negl Trop Dis*;4(2):e604.
- Daliry A., Pereira IR., Pereira P., Ramos IP., Vilar-Pereira G., Silveiras R. et al. (2014) Levels of circulating anti-muscarinic and anti-adrenergic antibodies and their effect on cardiac arrhythmias and dysautonomia in murine models of Chagas disease. *Parasitology. Nov*;141(13):1769-78.

- Deng X, Sabino EC, Cunha-Neto E, Ribeiro AL, Ianni B, Mady C, et al. (2013) Genome wide association study (GWAS) of Chagas cardiomyopathy in Trypanosoma cruzi seropositive subjects. *PloS one*;8(11): e79629.
- Díán M, et al. (2015) Acute chagas outbreaks: molecular and biological features of Trypanosoma cruzi isolates, and clinical aspects of acute cases in Santander, Colombia. *Parasites & Vectors*, , vol. 8, no 1, p. 608.
- Dias J et al. (2011) Mecanismos alternativos de transmissão do Trypanosoma cruzi no Brasil e sugestões para sua prevenção. *Rev Soc Bras Med Trop*, , vol. 44, no 3, p. 375-379.
- Díaz M. y Gónzales CI. (2014) Enfermedad de Chagas agudo: transmisión oral de Trypanosoma cruzi como una vía de transmisión re-emergente. *Revista de la Universidad Industrial de Santander. Salud*, vol. 46, no 2, p. 177-188.
- Dos Santos F, et al. (2014) CD8+ T cell-mediated immunity during Trypanosoma cruzi infection: ¿a path for vaccine development? *Mediators of Inflammation*, vol. 2014, p. 12.
- Duboscq-Bidot L., Charron P., Ruppert V., Fauchier L., Richter A., Tavazzi L. et al. (2009) Mutations in the ANKRD1 gene encoding CARP are responsible for human dilated cardiomyopathy. *Eur. Heart J.*, 30, 2128–2136.
- Echeverría LE, Morillo CA. (2019) American Trypanosomiasis (Chagas Disease). *Infectious Disease Clinics of North America*. Mar 1;33(1):119–34.
- Ferreira AV., Seggatto M., Menezes Z., Macedo AM., Gelape C. Teixeira M. et al.(2011) Evidence for Trypanosoma cruzi in adipose tissue in human chronic Chagas disease. *Microbes Infect.* Nov;13(12-13):1002-5.
- Ferreira LRP, Ferreira FM, Laugier L, Cabantous S, Navarro IC, da Silva Cândido D, *et al.* (2017) Integration of miRNA and gene expression profiles suggest a role for miRNAs in the pathobiological processes of acute Trypanosoma cruzi infection. *Sci Rep.* ; 7:17990.
- Fiedler LR. et al. (2019) MAP4K4 Inhibition Promotes Survival of Human Stem Cell-Derived Cardiomyocytes and Reduces Infarct Size In Vivo. *Cell Stem Cell.* Apr 4;24(4):579-591.e12. doi: 10.1016/j.stem.2019.01.013. Epub 2019 Mar 7.

- Fiedler, L., Chapman, K., *et al.* (2014) 157 Approaches for Pharmacological Inhibition of Cardiac Cell Death: MAP4K4 as a Therapeutic Target. *Heart*,; 100, pp. 91-92.
- Florez O, Martin J, Gonzalez CI. (2011) Interleukin 4, interleukin 4 receptor-alpha and interleukin 10 gene polymorphisms in Chagas disease. *Parasite immunology*. Sep;33(9):506-11.
- Florez O, Zafra G, Morillo C, Martin J, Gonzalez CI. (2006) Interleukin-1 gene cluster polymorphism in chagas disease in a Colombian case-control study. *Human immunology*. Sep;67(9):741-8.
- Frade AF., Pissetti CW., Lanni BM., Saba B., Lin-Wang HT., Nogueira LG. *et al.* (2013) Genetic susceptibility to Chagas disease cardiomyopathy: involvement of several genes of the innate immunity and chemokine-dependent migration pathways. *BMC infectious diseases*,; 13:587.
- Frazer KA, Murray SS, Schork NJ, Topol EJ. (2009) Human genetic variation and its contribution to complex traits. *Nat Rev Genet*,; 10(4):241-51.
- Freitas H, *et al.* (2005) Risk stratification in a Brazilian hospital-based cohort of 1220 outpatient with heart failure: role of Chagas' heart disease. *International Journal of Cardiology*, vol. 102, no 2, p. 239-247.
- Gabriel SB, Schaffner SF, Nguyen H, Moore JM, Roy J, Blumenstiel B, *et al.* (2002) The structure of haplotype blocks in the human genome. *Science*,;296(5576):2225-9.
- Gao X. *et al.* (2016) MAP4K4: an emerging therapeutic target in cáncer. *Cell Biosci* 6:56
- Gaussin V, Tomlinson JE, Depre C, Engelhardt S, Antos CL, *et al.* (2003) Common genomic response in different mouse models of beta-adrenergic-induced cardiomyopathy. *Circulation*. ; 108: 2926–2933.
- Genomes Project Consortium, Abecasis GR, Auton A, Brooks LD, DePristo MA, Durbin RM, *et al.* (2012) An integrated map of genetic variation from 1,092 human genomes. *Nature*,; 491(7422):56-65.

- Giraldo, N.A., Bolaños, N.L., Cuellar, A., Roa, N., Cucunubá, Z., Rosa., González, J.M. (2012) T Lymphocytes from Chagasic Patients Are Activated but Lack Proliferative Capacity and Down-Regulate CD28 and CD3. *Negl Trop Dis.* 2013;7(1): e2038. Keesen, T.S., Gomes, J.A., Fares, R.C., Araújo, F.F., Ferreira, K.S., Chaves, A.T., Rocha, M.O., Correo-Oliveira, R. Characterization of CD4+ Cytotoxic Lymphocytes and Apoptosis Markers Induced by *Trypanosoma cruzi* Infection. *Scandinavian Journal of Immunology*,; 76:311–319.
- Gouagna LC, Bancone G, Yao F, Yameogo B, Dabire KR, Costantini C, et al. (2010) Genetic variation in human HBB is associated with *Plasmodium falciparum* transmission. *Nat Genet.*; 42(4):328-31.
- Grant, A.V., Sabri, A., Abid, A., Abderrahmani Rhorfi, I., Benkirane, M., Souhi, H., et al. (2016) A genome-wide association study of pulmonary tuberculosis in Morocco. *Hum.Genet.*; 135 (3), 299–307.
- Gurung P., Kanneganti TD. (2016) Immune responses against protozoan parasites: a focus on the emerging role of Nod-like receptors. *Cell. Mol. Life Sci.*; 73:3035–51
- Hallows, K.R. *et al.* (2010) Role of the energy sensor AMP-activated protein kinase in renal physiology and disease. *American journal of physiology. Renal physiology*,; 298(5), pp. F1067-77.
- Hill AV. (2006) Aspects of genetic susceptibility to human infectious diseases. *Annual review of genetics*,;40:469-86
- Hotez PJ., *et al.* (2013) Innovation for the ‘bottom 100 million’: eliminating neglected tropical diseases in the Americas. *En Hot Topics in Infection and Immunity in Children IX.* Springer New York,. p. 1-12.
- Huang, H., Tang, Q., Chu, H., Jiang, J., Zhang, H., Hao, W., *et al.* (2014) MAP4K4 deletion inhibits proliferation and activation of CD4(+) T cell and promotes T regulatory cell generation in vitro. *Cellular Immunology*,; 289(1–2), 15–20.
- Instituto Nacional de Salud, Sivigila. (2018). Vigilancia rutinaria departamental y municipal. *INS, Colombia*

- Instituto nacional de salud. (2014). Protocolo de vigilancia en salud pública Chagas. INS, Colombia junio.
- International HIV Controllers Study, et al. (2010) The major genetic determinants of HIV-1 control affect HLA class I peptide presentation. *Science*; 330 (6010), 1551–1557.
- Iwakura Y., Ishigame H., Saijo., Nakae S. (2011) Functional specialization of interleukin-17 family members. *Immunity*. ;34(2):149-62
- Jackson Y., Chatelain E., Mauris A., Holst M., Miao Q., Chappuis F. (2013) Serological and parasitological response in chronic Chagas patients 3 years after nifurtimox treatment. *BMC Infect Dis*. Feb 13;13:85. doi: 10.1186/1471-2334-13-85.
- Jorde LB. (2000) Linkage disequilibrium and the search for complex disease genes. *Genome Res.*; 10(10):1435-44.
- Kaczkowski B, Rossing M, Andersen DK, Dreher A, Morevati M, Visser MA, *et al.* (2012) Integrative analyses reveal novel strategies in HPV11,-16 and -45 early infection. *Sci Rep.* ; 2:515.
- Kayama H y Takeda K. (2010) The innate immune response to *Trypanosoma cruzi* infection. *Microbes Infect.*; 12:511–17.
- Kierszenbaum F, et al. (1981) Antibody-independent, natural resistance of birds to *Trypanosoma cruzi* infection. *The Journal of Parasitology*; p. 656-660.
- Kwok P-Y. (2003) Single nucleotide polymorphisms: methods and protocols. Springer Science & Business Media.
- Laugier L., Frade, AF., Ferreira, FM., Baron MA., Teixeira PC., Cabantous S. et al. (2017) Whole-Genome Cardiac DNA Methylation Fingerprint and Gene Expression Analysis Provide New Insights in the Pathogenesis of Chronic Chagas Disease Cardiomyopathy. *Clin Infect Dis*. Oct 1;65(7):1103-1111.
- Lazarri C., Pereira M., Lorenzo M. (2013) Behavioural biology of Chagas disease vectors. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, , vol. 108, p. 34-47.

- Leon Rodriguez DA, Carmona FD, Echeverría LE, Gonzalez CI, Martin J. (2016) IL18 Gene Variants Influence the Susceptibility to Chagas Disease. *PLoS neglected tropical diseases*. Mar;10(3): e0004583.
- Leon Rodriguez DA, Echeverría LE, Gonzalez CI, Martin J. (2015) Investigation of the role of IL17A gene variants in Chagas disease. *Genes and immunity*. Dec;16(8):536-40.
- Leon Rodriguez DA., Carmona FD, González CI., Martin J. (2016) Evaluation of VDR gene polymorphisms in *Trypanosoma cruzi* infection and chronic Chagasic cardiomyopathy. *Sci Rep.* Aug 9; 6:31263.
- Leon Rodriguez DA., González CI., Martin J. (2016) Analysis of association of FOXO3 gene with *Trypanosoma cruzi* infection and chronic Chagasic cardiomyopathy. *HLA*. Jun;87(6):449-52.
- Leon Rodriguez DA., Acosta-Herrera M., Carmona FD., Dolade N., Vargas S., Echeverría LE., González CI., Martin J. (2018) Comprehensive analysis of three TYK2 gene variants in the susceptibility to Chagas disease infection and cardiomyopathy. *PLoS One*. Jan 5;13(1): e0190591.
- León Rodríguez, D. A. (2016) Estudio de las bases genéticas de la enfermedad de Chagas [tesis doctoral]. Universidad de Granada. Instituto de Parasitología y Biomedicina López-Neyra, CSIC; 233 p.
- Levick SP, Goldspink PH. (2014) Could interferon-gamma be a therapeutic target for treating heart failure? *Heart Fail Rev.*; 19:227–36.
- Lewis MD., Fortes Francisco A., Taylor MC., Burrell-Saward H., McLatchie AP., Miles MA., Kelly JM. (2014) Bioluminescence imaging of chronic *Trypanosoma cruzi* infections reveals tissue-specific parasite dynamics and heart disease in the absence of locally persistent infection. *Cell Microbiol.* Sep;16(9):1285-300.
- Lidani KC., Bavia L., Ambrosio AR., de Messias-Reason IJ. (2017) The Complement System: A Prey of *Trypanosoma cruzi*. *Front. Microbiol.*; 8:607.

- Ling S., Chen Y-T., Wang J., Richards A y Liew O-H. (2017) Ankyrin Repeat Domain 1 Protein: A Functionally Pleiotropic Protein with Cardiac Biomarker Potential. *Int. J. Mol. Sci.*, 18, 1362; doi:10.3390/ijms18071362.
- Ling S., Chen Y-T., Wang J., Richards A y Liew O-H. (2017) Ankyrin Repeat Domain 1 Protein: A Functionally Pleiotropic Protein with Cardiac Biomarker Potential. *Int. J. Mol. Sci.*, 18, 1362; doi:10.3390/ijms18071362.
- Liu X.H., Bauman W.A., Cardozo C. (2015) ANKRD1 modulates inflammatory responses in C2C12 myoblasts through feedback inhibition of NF- κ B signaling activity. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* ; 464:208–213.
- Machado F. et al. (2012) Current understanding of immunity to *Trypanosoma cruzi* infection and pathogenesis of Chagas disease. *En Seminars in Immunopathology*. Springer-Verlag,. p. 753-770.
- Machuca MA, Suarez EU, Echeverría LE, Martin J, Gonzalez CI. (2014) SNP/haplotype associations of CCR2 and CCR5 genes with severity of chagasic cardiomyopathy. *Human immunology*. Dec;75(12):1210-5.
- Mack, K. D., Von Goetz, M., Lin, M., Venegas, M., Barnhart, J., Lu, Y., et al. (2005) Functional identification of kinases essential for T-cell activation through a genetic suppression screen. *Immunology Letters*.; 96(1), 129–145.
- Magalhães LM., Villani FN., Nunes C., Gollob KJ., Rocha MO., Dutra WO. (2013) High interleukin 17 expression is correlated with better cardiac function in human Chagas disease. *J Infect Dis.* ;207(4):661-5
- Malaria Genomic Epidemiology, et al. (2015) A novel locus of resistance to severe malaria in a region of ancient balancing selection. *Nature*.; 526 (7572), 253–257
- Marber, M.S., Rose, B. & Wang, Y. (2011) The p38 mitogen-activated protein kinase pathway--a potential target for intervention in infarction, hypertrophy, and heart failure. *Journal of molecular and cellular cardiology*.; 51(4), pp.485–90.
- Marian AJ. (2012) Molecular genetic studies of complex phenotypes. *Translational research: the journal of laboratory and clinical medicine*. Feb;159(2):64-79.

- Marin-Neto J, et al. (2007) Pathogenesis of chronic Chagas heart disease. *Circulation*, , vol. 115, no 9, p. 1109-1123.
- McCarthy MI, Abecasis GR, Cardon LR, Goldstein DB, Little J, Ioannidis JP, et al. (2008) Genome-wide association studies for complex traits: consensus, uncertainty and challenges. *Nat Rev Genet.*;9(5):356-69
- Michael NL, Louie LG, Rohrbaugh AL, Schultz KA, Dayhoff DE, Wang CE, et al. (1997) The role of CCR5 and CCR2 polymorphisms in HIV-1 transmission and disease progression. *Nature medicine.*;3(10):1160-2. 65.
- Miller M.K., Bang M.L., Witt C.C., Labeit D. Trombitas C., Watanabe, K. et al. (2003) The muscle ankyrin repeat proteins: CARP, ANKRD2/ARPP and DARP as a family of titin filament-based stress response molecules. *J. Mol. Biol.*, 333, 951–964.
- Miller MK, Bang ML, Witt CC, Labeit D, Trombitas C, Watanabe K, *et al.* (2003) The muscle ankyrin repeat proteins: CARP, ankrd2/Arpp and DARP as a family of titin filament-based stress response molecules. *J Mol Biol.* ; 333:951–64.
- Miller SA, Dykes DD, Polesky HF. (1988) A simple salting out procedure for extracting DNA from human nucleated cells. *Nucleic Acids Res.*;16(3):1215.
- Moulik M., Vatta M., Witt SH., Arola MM., Murphy RT., McKenna WJ. et al. (2009) ANKRD1, the gene encoding cardiac ankyrin repeat protein, is a novel dilated cardiomyopathy gene. *J Am Coll Cardiol.* Jul 21;54(4):325-33.
- Mozzi A., Pontremoli C., Sironi M. (2018) Genetic susceptibility to infectious diseases: Current status and future perspectives from genome-wide approaches. *Infect Genet Evol.* Dec;66:286-307.
- Nagueh SF, Shah G, Wu Y, Torre-Amione G, King NM, *et al.* (2004) Altered titin expression, myocardial stiffness, and left ventricular function in patients with dilated cardiomyopathy. *Circulation.* ; 110: 155–162.
- Ng D., et al. (2013) Interpreting secondary cardiac disease variants in an exome cohort. *Circ Cardiovasc Genet.* Aug;6(4):337-46.

- Noireau F., Diosque P., Janser A. (2009) *Trypanosoma cruzi*: adaptation to its vectors and its host. *Veterinary Research*.; 40(2): 1-23.
- Olivera MJ., Fory JA., Porras JF., Buitrago G. (2019) Prevalence of Chagas disease in Colombia: A systematic review and meta-analysis. *PLoS ONE*.;14(01):1-18.
- Orally delivered siRNA targeting macrophage Map4k4 suppresses systemic inflammation. (2009) *Nature*.; 458(7242), 1180–1184.
- Ortega Zamora, Y., et al. (2017) Chagas disease immunogenetics: elusive markers of disease progression. *Expert Rev. Cardiovasc.; Ther.* 1–10.
- Parkin J y Cohen B. (2001) An overview of the immune system. *Lancet*.. Jun 2; 357(9270): 1777-89.
- Pereira K. et al. (2009) Chagas' disease as a foodborne illness. *Journal of Food Protection*, , vol. 72, no 2, p. 441-446.
- Pérez-Molina JA., Molina I. Chagas disease. *Lancet*. 2018; 391: 82–94
- Petersen, L., et al. (2010) Genetic influences on incidence and case-fatality of infectious disease. *PLoS One*;5 (5), e10603.
- Pinazo M., Gascon J. (2015) The importance of the multidisciplinary approach to deal with the new epidemiological scenario of Chagas disease (global health). *Acta Tropica*, , vol. 151, p. 16-20.
- Pritchard JK., Przeworski M. (2001) Linkage disequilibrium in humans: models and data. *Am J Hum Genet*. Jul;69(1):1-14.
- Purcell S, Neale B, Todd-Brown K, Thomas L, Ferreira MA, Bender D, et al. (2007) PLINK: a tool set for whole-genome association and population-based linkage analyses. *Am J Hum Genet*.; 81(3):559-75.

- Rassi A. y De Rezende J. (2012) American trypanosomiasis (Chagas disease). *Infectious Disease Clinics of North America*, , 26(2), p. 275-291.
- Rassi A. y Marin-Neto J. (2010) Chagas disease. *The Lancet*, 375(9723), 1388-1402.
- Ribeiro L., Nunes M., Teixeira M., Rocha M. (2012) Diagnosis and management of Chagas disease and cardiomyopathy. *Nature Reviews Cardiology*.; 9:576–589
- Rodeles LM., Vicco MH., Bontempi IA., Siano A., Tonarelli G., Bottasso O.et. (2016) Combined analysis of cross-reacting antibodies anti- β 1AR and anti-B13 in advanced stages of Chagas heart disease. *Trop Med Int Health*. Dec;21(12):1545-1551.
- Rose, B.A., Force, T. & Wang, Y. (2010) Mitogen-Activated Protein Kinase Signaling in the Heart: Angels Versus Demons in a Heart-Breaking Tale. *Physiological Reviews*.; 90(4), pp.1507–1546.
- Ruiz-Linares A, Adhikari K, Acuna-Alonzo V, Quinto-Sanchez M, Jaramillo C, Arias W, et al. (2014) Admixture in Latin America: geographic structure, phenotypic diversity and self-perception of ancestry based on 7,342 individuals. *PLoS Genet*.;10(9):e1004572
- Schijman A., et al. (2011) International study to evaluate PCR methods for detection of *Trypanosoma cruzi* DNA in blood samples from Chagas disease patients. *PLoS Neglected Tropical Diseases*, , vol. 5, no 1, p. e931.
- Shaw, M.A. (2017) Human genetic susceptibility to Chagas disease. *American Trypanosomiasis Chagas Disease*.;629–652.
- Shen L., Chen C., Wei X., Li X., Luo G., Zhang J., Bin J., Huang X., Cao S., Li G., *et al.* (2015) Overexpression of ankyrin repeat domain 1 enhances cardiomyocyte apoptosis by promoting p53 activation and mitochondrial dysfunction in rodents. *Clin. Sci.* ; 128:665–678.
- Shevach E. (2009) Mechanisms of foxp3⁺ T regulatory cell-mediated suppression. *Immunity*, , vol. 30, no 5, p. 636-645.

- Silva GK, et al. (2013) Apoptosis-associated speck-like protein containing a caspase recruitment domain inflammasomes mediate IL- 1b response and host resistance to *Trypanosoma cruzi* infection. *J Immunol.*;191(6):3373–83.
- Silverio, J.C., Pereira, I.R., Cipitelli, M.d.C., Vinagre, N.F., Rodrigues, M.M., et al. (2012) CD8+ T-Cells Expressing Interferon Gamma or Perforin Play Antagonistic Roles in Heart Injury in Experimental *Trypanosoma Cruzi*-Elicited Cardiomyopathy. *PLoS Pathog.*; 8(4): e1002645.
- Sin, Y.Y. & Baillie, G.S. (2012) Protein kinase D in the hypertrophy pathway. *Biochemical Society Transactions*;; 40(1), pp.287–289.
- Skol AD, Scott LJ, Abecasis GR, Boehnke M. (2006) Joint analysis is more efficient than replication-based analysis for two-stage genome-wide association studies. *Nat Genet.*;38(2):209-13.
- Sorensen, T.I., et al. 1988 () Genetic and environmental influences on premature death in adult adoptees. *N. Engl. J. Med.*; 318 (12), 727–732.
- Sousa-Rocha D., Thomaz M., Diniz LF., Souza PS., Pinge-Filho P., Toledo KA. (2015) *Trypanosoma cruzi* and Its Soluble Antigens Induce NET Release by Stimulating Toll-Like Receptors. *PLoS One*. Oct 2;10(10):e0139569.
- Steverding, Dietmar. (2014) The history of Chagas disease. *Parasites & Vectors*, , vol. 7, no 1, p. 1
- Teixeira AR., Hecht MM., Guimaro MC., Souza AO., Nitz N. (2011) Pathogenesis of chagas' disease: parasite persistence and autoimmunity. *Clin Microbiol Rev.* Jul;24(3):592-630. doi: 10.1128/CMR.00063-10.
- Than TM, Tran GV, Son K, Park EM, Kim S, Lim YS, *et al.* (2016) Ankyrin Repeat Domain 1 is Up-regulated During Hepatitis C Virus Infection and Regulates Hepatitis C Virus Entry. *Sci Rep.* ; 6:20819.
- Thye, T., Vannberg, F.O., Wong, S.H., Owusu-Dabo, E., Osei, I., Gyapong, J., et al. (2010) Genome-wide association analyses identifies a susceptibility locus for tuberculosis on chromosome 18q11.2. *Nat. Genet.*;42 (9), 739–741.

- Torres OA, Calzada JE, Beraun Y, Morillo CA, Gonzalez CI, Gonzalez A, et al. (2009) Association of the macrophage migration inhibitory factor -173G/C polymorphism with Chagas disease. *Human immunology*. Jul;70(7):543-6.
- Tournamille C, Colin Y, Cartron JP, Le Van Kim C. (1995) Disruption of a GATA motif in the Duffy gene promoter abolishes erythroid gene expression in Duffy-negative individuals. *Nat Genet.*;10(2):224-8.
- Tyler K.M. & Engman, D.M. (2001) The life cycle of *Trypanosoma cruzi* resided. *International Journal of Parasitology.*; 31(5):472-81.
- Vannberg FO, Chapman SJ, Hill AV. (2011) Human genetic susceptibility to intracellular pathogens. *Immunol Rev.*;240(1):105-16.c
- Vasconcelos RH, Montenegro SM, Azevedo EA, Gomes YM, Morais CN. (2012) Genetic susceptibility to chronic Chagas disease: an overview of single nucleotide polymorphisms of cytokine genes. *Cytokine.*;59(2):203-208.
- Virbasius J. y Czech M. (2016) MAP4K4 Signaling Nodes in Metabolic and Cardiovascular Diseases. *Trends in Endocrinology & Metabolism*, July, Vol. 27, No. 7.
- Vitelli-Avelar, D, et al. (2005) Chagasic patients with indeterminate clinical form of the disease have high frequencies of circulating CD3⁺ CD16⁺–CD56⁺ natural killer T cells and CD4⁺ CD25^{high} regulatory T lymphocytes. *Scandinavian Journal of Immunology*, , vol. 62, no 3, p. 297-308.
- Weatherall DJ, Clegg JB. (2002) Genetic variability in response to infection: malaria and after. *Genes Immun.*;3(6):331-7
- Wei YJ, Cui CJ, Huang YX, Zhang XL, Zhang H, *et al.* (2009) Upregulated expression of cardiac ankyrin repeat protein in human failing hearts due to arrhythmogenic right ventricular cardiomyopathy. *Eur J Heart Fail.* ; 11: 559–566.
- White NJ, Pukrittayakamee S, Hien TT, Faiz MA, Mokuolu OA, Dondorp AM. (2014) Malaria. *Lancet.*;383(9918):723-35.

- WHO. World Health Organization. (2019). Chagas disease (American trypanosomiasis). Retrieved 10 de agosto 2019, [https://www.who.int/en/news-room/fact-sheets/detail/chagas-disease-\(american-trypanosomiasis\)](https://www.who.int/en/news-room/fact-sheets/detail/chagas-disease-(american-trypanosomiasis))
- Williams-Blangero S, VandeBerg JL, Blangero J, Correa-Oliveira R. (2011) Genetic epidemiology of Chagas disease. *Adv Parasitol.*; 75:147-67.
- World Health Organization. (2015) Weekly epidemiological record Relevé épidémiologique hebdomadaire. *WHO, Geneva. February.*
- Yang, N. et al. (2015) Silencing SOX2 expression by RNA interference inhibits proliferation, invasion and metastasis, and induces apoptosis through Map4k4/JNK signaling pathway in human laryngeal cancer TU212 cells. *J. Histochem. Cytochem.*, 63, 721–733.
- Zafra G, Morillo C, Martin J, Gonzalez A, Gonzalez CI. (2007) Polymorphism in the 3' UTR of the IL12B gene is associated with Chagas' disease cardiomyopathy. *Microbes and infection / Institut Pasteur.* Jul;9(9):1049-52
- Zamboni DS., Lima-Junior DS. (2015) Inflammasomes in host response to protozoan parasites. *Immunol. Rev.*; 265:156–71 54.
- Zohn, I.E. *et al.* (2006) p38 and a p38-Interacting Protein Are Critical for Downregulation of E-Cadherin during Mouse Gastrulation. *Cell.*; 125(5), pp.957–969.