

**VARIANTES DE UN GEN CANDIDATO CON EXPRESIÓN DIFERENCIAL Y SU  
ASOCIACIÓN CON CARDIOMIOPATÍA CHAGÁSICA CRÓNICA**

**ERIKA CONCEPCIÓN BADILLO TRIANA**

**UNIVERSIDAD INDUSTRIAL DE SANTANDER  
FACULTAD DE SALUD  
DEPARTAMENTO DE CIENCIAS BASICAS  
MAESTRIA EN CIENCIAS BASICAS BIOMEDICAS  
BUCARAMANGA**

**2017**

**VARIANTES DE UN GEN CANDIDATO CON EXPRESIÓN DIFERENCIAL Y SU  
ASOCIACIÓN CON CARDIOMIOPATÍA CHAGÁSICA CRÓNICA**

**ERIKA CONCEPCIÓN BADILLO TRIANA**

Trabajo de grado presentado para optar al título de:

**MAESTRA EN CIENCIAS BÁSICAS BIOMÉDICAS**

**Director**

**CLARA ISABEL GONZÁLEZ RUGELES**

**MSc., *PhD***

**UNIVERSIDAD INDUSTRIAL DE SANTANDER**

**FACULTAD DE SALUD**

**DEPARTAMENTO DE CIENCIAS BASICAS**

**MAESTRIA EN CIENCIAS BASICAS BIOMEDICAS**

**BUCARAMANGA**

**2017**

## **DEDICATORIA**

A Dios que guía cada uno de mis pasos y le debo todo cuanto soy. A mi esposo Carlos Arturo por su amor y comprensión, así como por su capacidad de procurar mi crecimiento personal y profesional. A mi hija Ana Victoria que es la luz de mi vida y le da sentido a mis días. A mi madre querida quien siempre me ha apoyado en cada una de mis decisiones y me acompañó en este proceso regalándome su tiempo y dedicación al cuidado de mi familia. A mis hermanos y sobrinos que con su compañía y amor me hacen feliz.

## **AGRADECIMIENTOS**

A Dios por todos los dones recibidos que me permitieron culminar satisfactoriamente mis estudios.

A mi tutora la Dra. Clara Isabel González, por la oportunidad que me dio para hacer parte de su equipo de trabajo, brindándome las herramientas para el desarrollo de esta investigación. Le agradezco por su paciencia y su ejemplo.

A mis compañeros de maestría Karol y Javier por compartir conmigo no sólo el espacio académico sino por brindarme su amistad y apoyo durante este proceso.

A mis compañeros de laboratorio que en realidad son mis amigos. Fredy, Jenny, Sergio, Dorita y Martha Lucía, quienes me brindaron una amistad incondicional y me llenaron de alegría cuando más los necesité.

## Contenido

	Pág.
INTRODUCCIÓN	17
1. ENFERMEDAD DE CHAGAS	19
1.1. <i>Trypanosoma cruzi</i>	19
1.1.1. Ciclo de vida	20
1.2. Vectores y reservorios de <i>Trypanosoma cruzi</i>	22
1.3. Epidemiología	22
1.3.1. Mecanismos de transmisión	24
1.3.1.1. Transmisión vectorial	24
1.3.1.2. Hemotransfusión y trasplante de órganos	25
1.3.1.3. Transmisión vertical	25
1.3.1.4. Transmisión oral	25
1.3.1.5. Contaminación accidental	26
1.4. Aspectos clínicos de la enfermedad de Chagas	26
1.4.1. Fase aguda	27
1.4.2. Fase crónica	28
1.5. Diagnóstico en el laboratorio	30
2. PATOGÉNESIS DE LA ENFERMEDAD DE CHAGAS	31
2.1. Aspectos inmunológicos	31
2.1.1. Inmunidad innata	31
2.1.2. Inmunidad adaptativa	33
2.1.2.1. Respuesta humoral	33
2.1.2.2. Inmunidad celular adquirida	34
2.2. Susceptibilidad genética a la enfermedad de Chagas	35
2.3. Estudios de expresión	39

3. Integrinas	41
3.1. Integrina M ( $\alpha M\beta 2$ )	44
3.1.1. Procesos de señalización para la activación de Mac-1	46
4. Gen <i>ITGAM</i>	49
4.1. Polimorfismos del gen <i>ITGAM</i>	50
4.2. <i>ITGAM</i> y la enfermedad de Chagas	51
5. JUSTIFICACIÓN	52
6. OBJETIVOS	54
7. MATERIALES Y MÉTODOS	55
7.1. Población de estudio	55
7.1.1. Casos	55
7.1.2. Controles	56
7.2. Identificación de un gen con expresión diferencial	56
7.3. Selección de polimorfismos	56
7.4. Genotipificación de polimorfismos	57
7.5. Análisis estadístico	58
7.6. Consideraciones éticas	59
8. RESULTADOS	60
8.1. Análisis de la población	60
8.1.1. Variables demográficas	60
8.1.2. Variables clínicas	60
8.1.3. Equilibrio de Hardy-Weinberg	61
8.2. Análisis de asociación alélica y genotípica	61
8.2.1. Análisis de asociación alélica estratificado por género	63
8.2.2. Análisis de asociación alélica y genotípica con severidad	64

9. DISCUSIÓN	66
10. CONCLUSIONES	76
11. RECOMENDACIONES	77
BIBLIOGRAFÍA	78

## LISTA DE TABLAS

	Pág.
Tabla 1. Clasificación de la enfermedad de Chagas	29
Tabla 2. Polimorfismos genéticos estudiados en la enfermedad de Chagas	37
Tabla 3. Características demográficas y clínicas de la población en estudio	60
Tabla 4. Valores $p$ para el equilibrio de Hardy-Weinberg de las frecuencias alélicas de los polimorfismos estudiados	61
Tabla 5. Análisis de frecuencias alélicas y genotípicas de los polimorfismos del gen <i>ITGAM</i> en pacientes asintomáticos y con cardiomiopatía chagásica	62
Tabla 6. Análisis de interacción de los marcadores con género	63
Tabla 7. Análisis de frecuencias alélicas en hombres y mujeres	64
Tabla 8. Análisis de frecuencias alélicas y genotípicas de los polimorfismos del gen <i>ITGAM</i> en pacientes con cardiomiopatía chagásica leve y severa.	65

## LISTA DE FIGURAS

	Pág.
Figura 1. Estadios de <i>Trypanosoma cruzi</i>	20
Figura 2. Ciclo de vida de <i>Trypanosoma cruzi</i>	21
Figura 3. Distribución global de la enfermedad de Chagas en el mundo 2006-2010	24
Figura 4. Evolución clínica de la enfermedad de Chagas	26
Figura 5. Representación del heterodímero de integrinas	42
Figura 6. Procesos celulares que involucran la participación de integrinas $\beta 2$	43
Figura 7. Funciones pro-inflamatoria y anti-inflamatoria de Mac-1	45
Figura 8. Activación de Mac-1	46
Figura 9. Señalización bidireccional de Mac-1 en macrófagos	47
Figura 10. Localización y estructura del gen <i>ITGAM</i>	49
Figura 11. Mapa de desequilibrio de ligamiento del gen <i>ITGAM</i>	49
Figura 12. Vías biológicas y genes relacionados con <i>ITGAM</i>	50
Figura 13. Ensayo de genotipificación de SNPs	58
Figura 14. Vías de señalización potencialmente afectadas por los polimorfismos del gen <i>ITGAM</i> asociados con el desarrollo de CCC	73

## GLOSARIO

**Alelo:** Una de dos o más posibles variantes en la secuencia de un gen o locus particular.

**ADN - Ácido desoxirribonucleico:** Molécula de doble hélice que contiene la información genética transmitida de forma vertical para el desarrollo de los organismos vivos.

**Covariable:** Cualquier variable distinta de la exposición principal de interés, que puede ser un predictor del resultado esperado. Incluyen variables de confusión que además pueden asociarse con la exposición.

**Desequilibrio de ligamiento (DL):** Correlación entre dos variantes alélicas (generalmente cercanas) en el mismo cromosoma. Las variantes en DL se heredan juntas más a menudo de lo esperado por el azar.

**Equilibrio de Hardy-Weinberg:** Dada una frecuencia alélica menor de  $p$ , las probabilidades de los tres posibles genotipos ( $a/a$ ,  $A/a$ ,  $A/A$ ) en un locus bialélico con alelo mayor  $a$  y alelo menor  $A$  son  $(1 - p)^2$ ,  $2p(1 - p)$ ,  $p^2$ . Estas probabilidades deben ser estables de generación en generación en poblaciones homogéneas con entrecruzamientos al azar.

**Estudios de asociación genética:** Estudios que comparan las frecuencias alélicas o genotípicas de un marcador en individuos de una población con y sin una enfermedad o rasgo determinado, para establecer si existe una asociación estadística entre la enfermedad y el marcador genético.

**Exón:** Región codificante del ADN que se transcribe a ARN mensajero y posteriormente se traduce a proteína.

**Genotipo:** composición genética de un individuo, corresponde a los alelos para uno o más genes en el genoma de un organismo.

**Haplotipo:** Combinación de alelos de genes en un cromosoma.

**Intrón:** Segmento de DNA no codificante que separa los exones dentro de los genes. Se remueven por *splicing* del ARN no maduro para generar el ARN maduro.

**Locus:** Posición física que ocupa un gen dentro del genoma.

**MAF- Frecuencia alélica mínima:** Frecuencia del alelo menos común de un locus determinado dentro de una población.

**Metanálisis:** Método estadístico para contrastar y combinar resultados de diferentes estudios.

**$r^2$ :** Es una medida del desequilibrio de ligamiento entre dos marcadores calculado mediante la correlación entre los alelos del marcador.

**Rasgo poligénico:** Fenotipo que resulta de la interacción de dos o más genes.

**SNP – Polimorfismo de nucleótido simple:** es una variante genética que consiste en el cambio de un sólo nucleótido en el DNA, que por lo general resulta en dos posibles identidades alélicas en esa posición.

**TagSNP:** SNP representativo de una región del genoma.

## RESUMEN

**TÍTULO:** VARIANTES DE UN GEN CANDIDATO CON EXPRESIÓN DIFERENCIAL Y SU ASOCIACIÓN CON CARDIOMIOPATÍA CHAGÁSICA CRÓNICA\*

**AUTORES:** BADILLO TRIANA Erika Concepción \*\*; GONZÁLEZ RUGELES Clara Isabel.

**PALABRAS CLAVES:** Gen *ITGAM*, SNPs, Cardiomiopatía chagásica

### DESCRIPCIÓN

La patogénesis de la cardiomiopatía chagásica crónica (CCC) generada por la infección con *Trypanosoma cruzi*, no está totalmente definida. Entre 10-30% de las personas infectadas desarrolla cardiomiopatía, evidenciando el papel del componente genético. Por ello, se estudian polimorfismos de nucleótido simple (SNPs) como posibles marcadores de susceptibilidad o resistencia. El presente estudio buscó establecer asociación de los polimorfismos rs9888879, rs889551, rs1143679 y rs7206295 del gen *ITGAM* (cadena alfa de la integrina M) con desarrollo y severidad de CCC. Se utilizó un diseño de casos y controles con 685 individuos seropositivos a antígenos de *T. cruzi* de zonas endémicas de Santander, clasificados como pacientes con cardiomiopatía y asintomáticos (377 casos y 308 controles). La genotipificación se realizó por RT-PCR utilizando sondas TaqMan. Los datos se analizaron con el software PLINK. El alelo A del rs1143679 se asoció con susceptibilidad de desarrollar cardiomiopatía chagásica ( $p = 0.0005$ ; OR=1,7; IC 95% 1,3–2,2). El alelo A del rs889551 se asoció con mayor severidad y susceptibilidad al desarrollo de CCC en hombres ( $p = 0,006$  OR 1,64 IC 95% 1,15 – 2,37). No se encontraron diferencias estadísticamente significativas con los otros polimorfismos, ni con severidad. En estudio previo, el gen *ITGAM* mostró expresión diferencial entre individuos con y sin cardiomiopatía. La integrina M tiene funciones proinflamatorias e inmunomoduladoras, por lo cual un aumento en su expresión podría favorecer el mantenimiento de una respuesta inmune activada. Así mismo defectos en su estructura conducirían a la pérdida de sus funciones reguladoras. Estos aspectos son de importancia en la CCC puesto que un desequilibrio en la respuesta inmune podría estar relacionado con la patogénesis de la enfermedad de Chagas. Los datos sugieren que el alelo A del rs1143679 y el alelo A del rs889551 del gen *ITGAM*, son marcadores de riesgo para progresión a CCC en la población estudiada.

---

\*Trabajo de grado

\*\*Facultad de salud. Programa de Maestría en Ciencias Básicas Biomédicas. Directora de tesis Clara Isabel González Rugeles

## ABSTRACT

**TITLE:** VARIATIONS OF A GEN CANDIDATE WITH DIFFERENTIAL EXPRESSION AND ITS ASSOCIATION WITH CHRONIC CHAGASIC CARDIOMYOPATHY

**AUTHORS:** BADILLO TRIANA Erika Concepción; GONZÁLEZ RUGELES Clara Isabel.

**KEY WORDS:** *ITGAM* gene, SNPs, chagasic cardiomyopathy

### DESCRIPTION

The pathogenesis of chronic Chagas cardiomyopathy (CCC) generated by infection with *Trypanosoma cruzi*, is not fully defined. Between 10-30% of infected people, develop cardiomyopathy, demonstrating the role of genetic component. Thus, single nucleotide polymorphisms (SNPs) are studied as potential markers of susceptibility or resistance. The present study aims to establish association of polymorphisms rs9888879, rs889551, rs1143679 and rs7206295 of *ITGAM* gene (integrin alpha M chain) with development and severity of CCC. A design of cases and controls was performed with 685 seropositive individuals to *T. cruzi* antigens in endemic areas of Santander, classified as cardiomyopathy and asymptomatic patients (377 cases and 308 controls). Genotyping was performed using RT-PCR TaqMan probes. Data was analysed with the software PLINK. The A allele of SNP rs1143679 was associated with susceptibility to develop Chagas cardiomyopathy ( $p = 0.0005$ ; OR = 1.7; 95% CI 1.3-2.2). The allele A of rs889551 was associated with increased severity and susceptibility to the development of CCC in men ( $p = 0.006$  OR 1.64 95% CI 1.15 to 2.37). Other polymorphisms have not statistically significant differences with susceptibility or severity. In previous study, the *ITGAM* gene showed differential expression between individuals with and without cardiomyopathy. The M integrin has proinflammatory and immunomodulatory functions, whereby an increase in expression could favour the maintenance of an immune response activated. Likewise, structural defects lead to the loss of regulatory functions. These aspects are of importance in the CCC since an imbalance in the immune response is related to the pathogenesis of Chagas disease. The data suggest that the SNP rs1143679 A allele and the SNP rs889551 A allele of *ITGAM* gene, are markers of risk for progression to CCC in the study population.

---

\*Bachelor thesis

\*\*Health Faculty. Biomedics Basic Sciences Master Program. Thesis Director Clara Isabel González Rugeles

## INTRODUCCIÓN

La enfermedad de Chagas (EC) es causada por la infección con el parásito protozoario *Trypanosoma cruzi*, con alta prevalencia en América Latina, donde se estima que 10 millones de personas están infectadas y al menos 120 millones en riesgo de adquirir la infección (OMS, 2010). En Colombia se calculan 700.000 a 1.200.000 individuos infectados y cerca de 131.474 pacientes con cardiomiopatía chagásica crónica (CCC). La enfermedad se desarrolla en dos fases, una aguda generalmente asintomática y una crónica. En esta última, el 70% de los pacientes cursa sin evidencia de alteraciones clínicas (forma indeterminada) y cerca de un 30%, 10 a 20 años después de la infección, desarrolla patologías asociadas a tejido cardíaco y/o digestivo, con una tasa del 1 al 2% anual (INS, 2014). Múltiples investigaciones se han realizado para explicar por qué sólo entre un 10 a 30% de los sujetos infectados con *T. cruzi* desarrollan cardiomiopatía, concluyendo que, tanto factores del parásito como del hospedero estarían implicados.

Dentro del genoma humano las variantes de único nucleótido (SNP) han sido ampliamente utilizadas para explicar la susceptibilidad o resistencia a numerosas patologías comunes, tanto crónicas como infecciosas. Los SNPs pueden influir en la estabilidad del mRNA y la eficiencia de la traducción, presentando un papel directo con o sin otros factores en la expresión fenotípica de enfermedades o rasgos (Kwok, 2003). En el caso de la EC, polimorfismos presentes en genes del complejo mayor de histocompatibilidad, citoquinas, quimioquinas, genes codificantes de proteínas del citoesqueleto, canales iónicos y transportadores de lípidos, se han asociado con susceptibilidad o resistencia al desarrollo de la CCC. El Grupo de Inmunología y Epidemiología Molecular (GIEM) adelanta estudios de expresión génica diferencial en células de sangre periférica de individuos seropositivos y seronegativos retadas con *T. cruzi*. Los resultados obtenidos en este tipo de ensayos permiten la identificación de genes candidatos implicados en el desarrollo

de la EC. Por este motivo el presente estudio seleccionó el gen *ITGAM* que presentó mayor expresión en pacientes con CCC en respuesta a la presencia de *T. cruzi* en comparación con pacientes asintomáticos. *ITGAM* codifica para la cadena alfa de la integrina M también conocida como Mac-1 o CD11b que se expresa en neutrófilos, monocitos, macrófagos y algunos subtipos de linfocitos activados (Roberts *et al.*, 2016). Esta integrina puede unir múltiples ligandos, participa en fagocitosis, tráfico de leucocitos y regulación de la producción de citoquinas, actividades que son de importancia en la patogénesis de la EC. Los polimorfismos del gen fueron genotipificados para determinar su asociación con el desarrollo de la CCC.

## 1. ENFERMEDAD DE CHAGAS

La enfermedad de Chagas (EC) o tripanosomiasis americana fue descrita en 1909 por Carlos Chagas, quien identificó al parásito *Trypanosoma cruzi* como su agente causal. Es posible que durante millones de años los insectos vectores (triatominos) mantuvieran la diseminación del parásito entre animales silvestres en el centro y sur de América, hasta que éste llegara a animales domésticos y seres humanos hace más de 9000 años (Aufderheide *et al.*, 2004). De esta manera la enfermedad es endémica en América Latina, pero dado el incremento de la migración, ha llegado a zonas no endémicas en las cuales la transmisión se da por transfusión sanguínea y trasplante de órganos (Dutra *et al.*, 2014).

Se estima que 10 millones de personas tienen la enfermedad y 120 millones están en riesgo de adquirirla. Después de décadas de infección un 30% de los pacientes desarrolla cardiomiopatía y un 5 a 10% desórdenes digestivos, produciéndose 50.000 muertes por año (OMS, 2010).

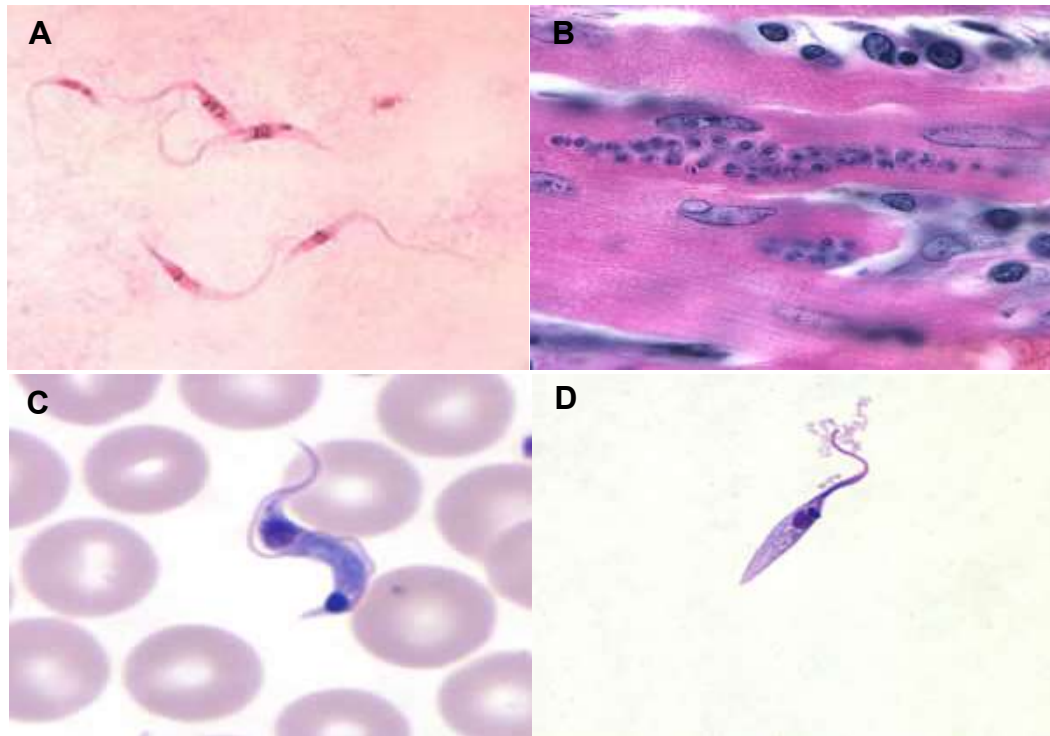
### 1.1 *Trypanosoma cruzi*

Parásito flagelado de la clase *Amastigophora*, orden *Kinetoplastida*, familia *Trypanosomatidae*, género *Trypanosoma*. Presenta cuatro estadios durante su ciclo de vida:

- Tripomastigote metacíclico: es la forma infectante no replicativa, se desarrolla en el intestino y el recto del insecto vector. Su kinetoplasto se ubica posterior al núcleo y posee forma delgada y alargada (Figura 1A).
- Amastigote: se localiza en el citoplasma de la célula hospedera donde se replica por fisión binaria, es redondeado y sin flagelo (Figura 1B).
- Tripomastigote sanguíneo: Luego de varias divisiones los amastigotes se transforman a tripomastigotes, con forma alargada y flagelada, rompen la

célula y se liberan al torrente sanguíneo diseminándose a nuevas células (Figura 1C).

- Epimastigote: presenta el kinetoplasto anterior al núcleo y el flagelo, forma alargada y móvil, se replica en el intestino del vector (Figura 1D) (Díaz & González, 2014).

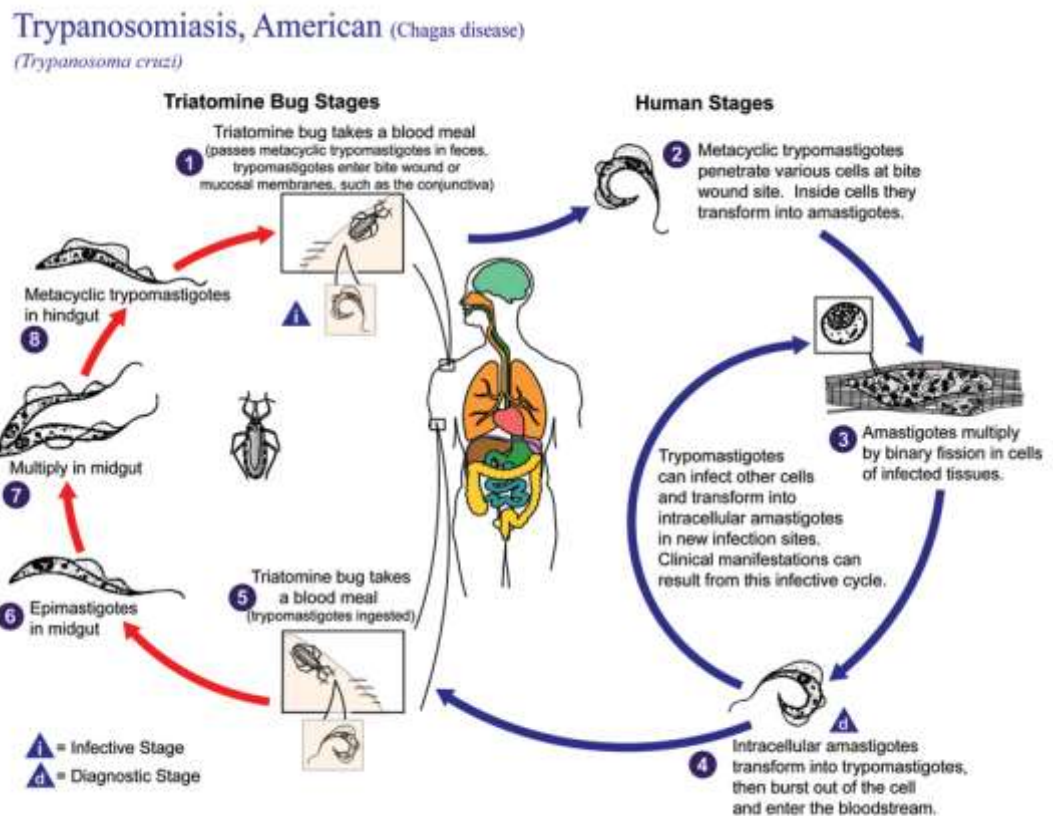


**Figura 1.** Estadios de *Trypanosoma cruzi*. (A) Tripomastigotes metacíclicos. (B) Amastigotes en tejido cardiaco. (C) Tripomastigote sanguíneo en extendido de sangre periférica. (D) Epimastigote de cultivo. Tomado de <http://www.cdc.gov/dpdx/trypanosomiasisAmerican/gallery.html#epimastigote>.

### 1.1.1 Ciclo de vida

La transmisión inicia cuando los insectos de la familia *Reduviidae* se alimentan de un vertebrado infectado, tomando la sangre que contiene tripomastigotes. En el estómago del insecto muchos tripomastigotes mueren, pero los que sobreviven se diferencian a epimastigotes, que migran al intestino medio y se dividen activamente manteniéndose unidos a las microvellosidades de la membrana intestinal. Luego se

desprenden y se diferencian a tripomastigotes metacíclicos, los cuales en el intestino grueso se mezclan con orina y heces y se liberan en el próximo ciclo de alimentación del insecto. La infección humana se da cuando el parásito presente en las heces que deposita el vector al alimentarse, penetra la mucosa o la piel lesionada e invade macrófagos, fibroblastos y células epiteliales. Inicialmente se mantiene en una vacuola parasitófora, posteriormente se transforma a amastigote y luego de varias rondas de replicación en el citoplasma, se libera al torrente sanguíneo como tripomastigote metacíclico (Figura 2). De esta manera llega a múltiples tejidos diana y establece una infección persistente (Jimenez, 2014).



**Figura 2.** Ciclo de vida de *Trypanosoma cruzi*. Tomado de <http://www.cdc.gov/parasites/chagas/biology.html>

## **1.2 Vectores y reservorios de *Trypanosoma cruzi***

Los triatomíneos del orden *Hemiptera*, familia *Reduviidae* y subfamilia *Triatominae*, son un grupo formado por cerca de 140 especies, muchas de las cuales son vectores de la enfermedad de Chagas. Se alimentan de mamíferos pequeños terrestres y arbóreos, como didélfidos y roedores. Varias especies han colonizado las viviendas humanas por lo que transmiten el parásito a mamíferos domésticos y a los humanos. Los triatomíneos de mayor importancia epidemiológica pertenecen a las especies *Triatoma infestans*, *Triatoma dimidiata*, *Rhodnius prolixus* (Lazzari *et al.*, 2013), *Triatoma brasiliensis* y *Panstrongylus megistus*. *T. infestans* y *R. prolixus* están presentes en el ciclo doméstico, *T. dimidiata* y *T. brasiliensis* se diseminan en hábitats selváticos, peri-domésticos y domésticos (Gourbiere *et al.*, 2012).

Se han reportado 100 especies de mamíferos como reservorios naturales de *T. cruzi* y se considera que todos los mamíferos son susceptibles a la infección. Las aves no se infectan debido a que eliminan el parásito por lisis mediada por el complemento (Kierszenbaum *et al.*, 1981). La importancia epidemiológica de los reservorios varía de acuerdo a la región geográfica, debido a la biología y ecología de los mamíferos y vectores, dado que su interacción repercute en el riesgo de infección humana. En América latina los perros son un reservorio importante y pueden ser usados como centinela para localizar la transmisión (Bern *et al.*, 2011).

## **1.3 Epidemiología**

La EC se considera endémica en 21 países de América Latina. En el mundo se calcula que existen 10 millones de personas infectadas con *T. cruzi* y más de 100 millones en riesgo de adquirir la infección. Se han identificado cinco periodos epidemiológicos en la EC. Durante el periodo pre-homínido el parásito debió mantenerse circulante en animales silvestres. El segundo periodo inició cuando el hombre llegó a tierra americana y se produjeron las primeras infecciones accidentales hace cerca de 26.000 años. Un tercer período comenzó con el desarrollo de la agricultura, cuando la deforestación causada por el hombre condujo al transporte de vectores, contribuyendo a la generación de focos zoonóticos. El

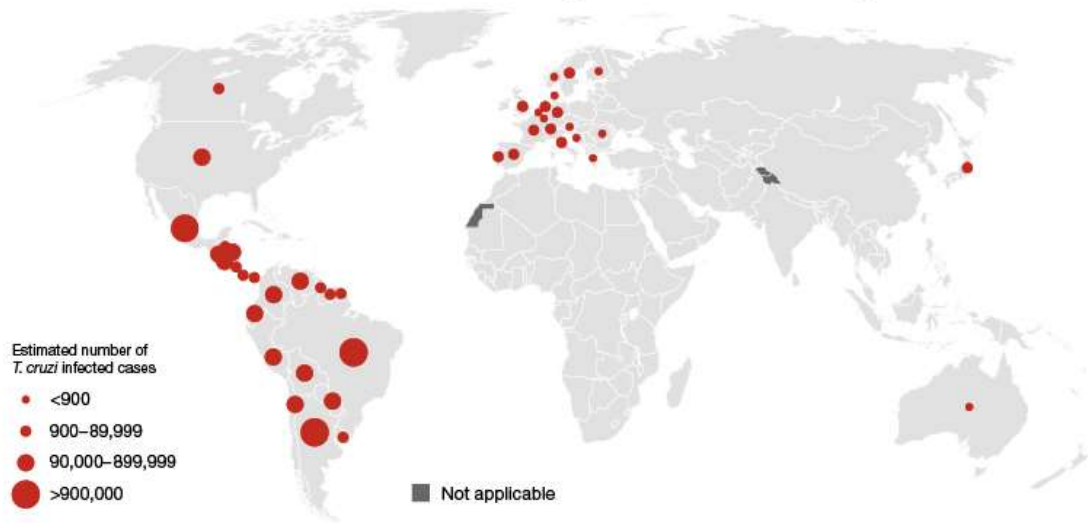
cuarto periodo se desarrolló durante el siglo XX con el primer estudio de la EC y la implementación de iniciativas de control para interrumpir la propagación de la infección. Al mismo tiempo incrementaron los flujos de migración de la población a zonas urbanas. Finalmente en el quinto periodo epidemiológico la enfermedad se convirtió en un problema de salud pública mundial, caracterizada por alta morbilidad y mortalidad, barreras psicosociales y médicas para el diagnóstico, tratamiento y control, debido principalmente a la disponibilidad limitada de recursos. (OMS, 2015)

En los últimos años la epidemiología ha sido modificada por los cambios climáticos y los fenómenos de migración. En el siglo XX Estados Unidos y Europa se convirtieron en los principales receptores de inmigrantes latinoamericanos. Actualmente se calcula 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 y Francia (Steverding, 2014).

Ahora bien, de acuerdo a datos reportados por la OMS para el año 2010, el número de personas infectadas por *T. cruzi* en América Latina era 5.742.167. Argentina, Brasil y México representan los países con mayor número de casos, seguidos por Bolivia y Colombia. De nuevos casos debidos a la transmisión vectorial Bolivia tenía el número más alto, seguido por México y Colombia (Figura 3). (OMS, 2015).

En Colombia existe una tasa de prevalencia de 0,95% con una tasa de incidencia de 0,01%. El número de mujeres infectadas entre los 15 y 44 años es de 116.221, mientras que se calculan cerca de 5 millones de personas en riesgo de infección que habitan zonas endémicas. Por otra parte, el número de pacientes con CCC se estima en 131.474 (INS, 2014). Para el año 2015 se notificaron 905 casos de Chagas. Los departamentos con mayor reporte de casos fueron Santander (173), Casanare (156), Boyacá (126), Guajira (83), y Cesar (70). En Santander el mayor número de reportes se realizó en Mogotes, Coromoro, Landázuri, Socorro, Ocamonte y Bucaramanga (INS, 2015).

### Worldwide distribution of Chagas disease cases, 2006-2010



Source: Sustaining the drive to overcome the global impact of neglected tropical diseases: Second WHO report on neglected tropical diseases (2013)

**Figura 3.** Distribución de la enfermedad de Chagas en el mundo 2006-2010. Tomado de WHO (2013).

#### 1.3.1 Mecanismos de transmisión

##### 1.3.1.1 Transmisión vectorial

Mecanismo en el cual los tripomastigotes metacíclicos presentes en las heces infectadas de los insectos vectores penetran a través de laceraciones, la piel o la mucosa de los mamíferos (Díaz & González, 2014). Representa el 70% de los casos y se ha mantenido en muchos países debido a la domiciliación de los triatominos. La implementación de programas de control comenzó en los años 90 logrando la interrupción de los ciclos doméstico y peridoméstico con el uso de insecticidas. Brasil, Uruguay y Chile fueron declarados libres de la transmisión por *T. infestans*. Sin embargo, se ha demostrado la recolonización de casas por triatominos silvestres explicando las dificultades encontradas con el control del vector (Pinazo & Gascon, 2015).

### **1.3.1.2 Hemotransfusión y trasplante de órganos**

Se ha establecido que todos los componentes de la sangre son infectantes. En países no endémicos, la transmisión transfusional es considerada la principal forma de infección. Un estudio realizado en España determinó que el 0,62% de los donantes americanos eran positivos para EC y el porcentaje aumentaba a 10% cuando sólo se evaluaban individuos provenientes de Bolivia. Datos de EUA, Canadá y Alemania han reportado 1 a 5% de donantes seropositivos (Pinazo & Gascon, 2015).

Por otra parte, Colombia en el año 1995 reglamentó mediante la resolución 1738 el tamizaje obligatorio para la EC de las unidades transfusionales en bancos de sangre. A pesar de cumplir plenamente con el tamizaje, el riesgo de infección se mantiene debido a que los test de diagnóstico no poseen sensibilidad del 100% (INS, 2014).

### **1.3.1.3 Transmisión vertical**

Representa uno de los principales retos de la salud en países endémicos. La transmisión al feto se produce en cualquier fase de la infección materna, en la gestación o durante el parto. Para 2014 se reportaron tasas mundiales de transmisión congénita del 1 al 28,6%. La OMS estimó que el número de casos de infección congénita por *T. cruzi* es alrededor de 8.668 casos por año (2015). En Europa y USA se estima cada año entre 20-183 y 65-115 nacidos infectados por *T. cruzi* respectivamente. En Colombia se estiman 1.046 casos de infección con una incidencia de 0,114% (OMS, 2015).

### **1.3.1.4 Transmisión oral**

La infección oral es causada por la ingesta de bebidas o alimentos contaminados con triatomíneos infectados o con sus heces. Puede presentarse cuando las frutas o alimentos son rociados con las secreciones de las glándulas anales odoríferas de los animales del género *Didelphis* infectados con *T. cruzi*. De igual forma el consumo de carne mal cocida de animales silvestres infectados o la ingestión de alimentos

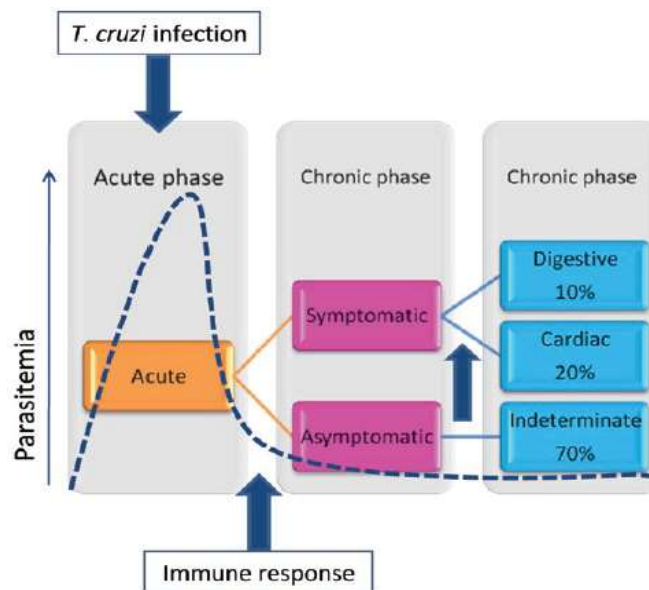
contaminados con deyecciones de los triatominos puede conducir a la infección por la ruta oral (Díaz & González, 2014). En los últimos años ha incrementado el reporte de brotes, principalmente en ambientes silvestres pero también en áreas urbanas. Se han reportado brotes orales en Brasil, Venezuela, Colombia, México, Argentina y Bolivia (Pinazo & Gascon, 2015).

### 1.3.1.5 Contaminación accidental

Debida al contacto de mucosas o microlesiones con *T. cruzi* en trabajos experimentales con mamíferos infectados, cultivos, material infectado, captura del vector en áreas endémicas, o contaminación quirúrgica a partir de pacientes agudos. Se consideran factores de riesgo la falta de capacitación, carencia de atención, mal uso de equipos de protección, instalaciones o equipos inadecuados y mala iluminación (Dias *et al.*, 2011).

## 1.4 Aspectos clínicos de la enfermedad de Chagas

La enfermedad cursa con dos fases, aguda y crónica cada una de ellas con características clínicas diferentes (Figura 4).



**Figura 4.** Evolución clínica de la enfermedad de Chagas. Tomado de Dutra *et al.*; 2009.

### 1.3.1 Fase aguda

La fase aguda generalmente se presenta con síntomas inespecíficos que incluyen fiebre, cefalea, astenia, anorexia, artralgia y hepatoesplenomegalia leve. Se acompaña de alta carga parasitaria en sangre y tejidos, y tiene una duración de 2 a 4 meses. Cuando el sitio de inoculación del parásito es la conjuntiva, se desarrolla un edema periorbital conocido como signo de Romaña y aparece un nódulo cutáneo llamado chagoma (Coura, 2007).

La dinámica inmunológica durante la fase aguda se desarrolla cuando los componentes de *T. cruzi*, incluso el DNA y las glicoproteínas de superficie, activan la inmunidad innata mediante los receptores tipo Toll en macrófagos y células dendríticas. Posterior a su activación las células secretan citoquinas proinflamatorias, expresan receptores co-estimuladores e incrementan la endocitosis y la muerte intracelular del parásito, a través de la liberación de especies reactivas de oxígeno y nitrógeno. Los macrófagos y células dendríticas que han endocitado el parásito, generan una fuerte respuesta de anticuerpos y células T contra *T. cruzi*. Se producen células T específicas productoras de INF $\gamma$ , las cuales migran al sitio de inflamación inducido por el parásito, incluido el miocardio. Durante la fase aguda los pacientes muestran un incremento en los niveles circulantes de IL-6 y TNF $\alpha$ , y una producción incrementada de INF $\gamma$  por células mononucleares (Cunha-Neto & Chevillard, 2014). La respuesta inmune mediada por células controla la replicación del parásito, resuelve los síntomas espontáneamente y la parasitemia desaparece en 4 a 8 semanas. Las personas entonces ingresan a la fase crónica de la enfermedad (Bern, 2015).

La gran mayoría de infecciones agudas nunca se detectan, sin embargo, en pacientes inmunodeprimidos y recién nacidos la fase aguda puede ser severa y se acompaña de meningoencefalitis o miocarditis. En estos casos se registra en el electrocardiograma taquicardia sinusal, bloqueo atrioventricular de primer grado, bajo voltaje de la onda QRS y alteraciones primarias de la onda T. En radiografía de tórax puede observarse agrandamiento de la silueta cardiaca. La tasa de

mortalidad suele ser inferior al 10%. La causa de muerte puede ser falla cardiaca, meningitis o encefalitis (Teixeira *et al.*, 2014). Por otra parte, los brotes orales se asocian con una mayor incidencia de miocarditis y mayor tasa de casos fatales que las infecciones a través del vector (Bern, 2015).

#### **1.4.2 Fase crónica**

En la fase crónica se presentan dos formas típicas, la forma indeterminada presente en un 70% de los pacientes seropositivos y la forma determinada con compromiso cardiaco o digestivo en un 10-30% de los individuos (Ribeiro *et al.*, 2012).

La fase indeterminada se caracteriza por presentar test serológico positivo con anticuerpos IgG específicos para *T. cruzi* o demostración parasitológica del agente infeccioso. No se evidencian signos ni síntomas de la EC o anormalidades electrocardiográficas. Se observa un tamaño normal del corazón, esófago y colon sin alteraciones al examen con rayos X. La expectativa de vida de estos pacientes es igual a la de un individuo no infectado (Teixeira *et al.*, 2011).

Entre los pacientes que progresan a la forma determinada, el 94,5% de los casos desarrolla cardiomiopatía chagásica crónica (CCC), 38,5% de estos mueren por muerte súbita y el 56% padece insuficiencia cardíaca. El remanente 5,5% desarrolla síndromes digestivos (Teixeira *et al.*, 2011). Como indicadores de mal pronóstico en la CCC se encuentran alteraciones electrocardiográficas, género masculino, presión sistólica menor de 120 mmHg, función sistólica deteriorada, dilatación del ventrículo izquierdo y aparición de arritmias durante la prueba de esfuerzo. Una revisión de estudios observacionales sobre predictores de mortalidad en EC, concluyó que el deterioro en la función ventricular, la clase funcional NYHA (III-IV), cardiomegalia y taquicardia ventricular no sostenida son los principales marcadores de morbimortalidad (Ribeiro *et al.*, 2008). La EC se clasifica clínicamente de acuerdo a los síntomas, anormalidades radiológicas y electrocardiográficas, y cambios en la función del ventrículo izquierdo (Tabla 1).

**Tabla 1. Clasificación de la enfermedad de Chagas**

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

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

En las formas digestivas puede desarrollarse megacolon o megaesófago, hay destrucción del plexo mientérico y alteraciones en los patrones de secreción, motilidad y absorción de nutrientes (Coura, 2007).

En pacientes inmunodeprimidos y recién nacidos se presenta con baja frecuencia una forma severa caracterizada por meningoencefalitis con lesiones cerebrales similares a tumores. Por otra parte algunos pacientes chagásicos desarrollan disfunción del sistema nervioso autónomo (Py, 2011).

Durante la fase crónica de la infección se producen citoquinas proinflamatorias Th1. Niveles incrementados de TNF $\alpha$  en el plasma y células mononucleares de sangre

periférica productoras de INF $\gamma$ , se detectan en pacientes con CCC y aún en pacientes asintomáticos, probablemente como respuesta a la persistencia del parásito. Los pacientes que desarrollan CCC muestran fuerte respuesta de tipo Th1 en comparación con los asintomáticos. La exacerbada respuesta Th1 observada en sangre periférica de pacientes con CCC se refleja en el infiltrado inflamatorio de tejido cardíaco, en el cual predomina el perfil Th1 con secreción de INF $\gamma$  y TNF $\alpha$ , con baja producción de IL-4, IL-6, IL7, e IL-15 (Cunha-Neto & Chevillard, 2014).

#### **1.4 Diagnóstico en el laboratorio**

El diagnóstico se realiza dependiendo de la fase de la enfermedad. Durante la fase aguda se llevan a cabo exámenes parasitológicos, que permiten la visualización de las formas tripomastigotes en sangre o *buffy coat*. Los parásitos pueden visualizarse mediante examen directo de sangre fresca, frotis o extendido de sangre periférica, gota gruesa, microhematocrito o microstrout y strout. También puede emplearse el hemocultivo en medio difásico Novy-Mc Neal-Nicoll (NNN) e infusión de hígado y triptosa (LIT), el xenodiagnóstico y la inoculación de animales de laboratorio (INS, 2014). La reacción en cadena de la polimerasa (PCR) representa una herramienta sensible en la fase aguda y es útil para realizar una detección temprana de la infección en pacientes trasplantados, recién nacidos o después de la exposición a un accidente biológico (Bern, 2015).

En la fase crónica el diagnóstico se realiza por métodos serológicos mediante ensayo por inmun absorción ligado a enzimas (ELISA), inmunofluorescencia indirecta (IFI), inmunocromatografía o hemaglutinación indirecta (HAI), para la búsqueda de anticuerpos IgG contra *T. cruzi*. Un único ensayo no tiene la suficiente sensibilidad y especificidad para realizar el diagnóstico en fase crónica, por lo cual se requieren resultados positivos en dos pruebas basadas en diferentes principios para realizar la confirmación (Bern, 2015).

## **2. PATOGÉNESIS DE LA ENFERMEDAD DE CHAGAS**

Se han propuesto diferentes teorías para explicar las lesiones en el tejido de los pacientes con EC incluidas la persistencia del parásito, la autoinmunidad y la teoría neurogénica (Teixeira *et al*, 2011).

La persistencia del parásito se ha comprobado mediante el uso de técnicas con mayor sensibilidad para la detección de DNA, proteínas y parásitos intactos en el tejido. La presencia del parásito en un tejido particular se correlaciona específicamente con el desarrollo de la afección, es decir, en los individuos con falla cardiaca se detecta DNA en tejido cardiaco pero no en tejido esofágico sano. Además, algunos modelos de re-infección muestran que el aumento en la carga parasitaria favorece la severidad de la enfermedad. Otros estudios han determinado que la EC no se mantiene y no se desarrolla en ausencia de la infección, motivo por el cual no puede ser considerada una enfermedad autoinmune (Tarleton, 2003). Por otra parte, la teoría neurogénica presenta la hipótesis de que el parásito produce una neurotoxina responsable de la pérdida de neuronas que ocurre en la EC. Sin embargo, no se ha demostrado la existencia de esta neurotoxina u otro tipo de toxina liberada por *T. cruzi* (Teixeira *et al*, 2011). Finalmente, es claro que 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 (Tarleton, 2003).

### **2.1 Aspectos inmunológicos**

#### **2.1.1 Inmunidad innata**

La inmunidad innata ha sido reportada como un factor relevante en el hospedero de *T. cruzi*. Las subpoblaciones de leucocitos de sangre periférica en niños infectados en fase indeterminada temprana se caracterizan por porcentajes incrementados de células NK CD3<sup>-</sup>CD16<sup>+</sup>CD56<sup>-</sup> y monocitos con perfil proinflamatorio (CD14<sup>+</sup>CD16<sup>+</sup>HLA-DR<sup>++</sup>). Además en estos pacientes, los altos valores de linfocitos

B activados CD19<sup>+</sup>CD23<sup>+</sup> se correlacionan con un desequilibrio en la activación de células T, evidenciado por la baja frecuencia de linfocitos CD4<sup>+</sup>CD38<sup>+</sup>/HLA-DR<sup>+</sup>, CD8<sup>+</sup> CD38<sup>+</sup>/HLA-DR<sup>+</sup> y células T reguladoras CD4<sup>+</sup>CD25<sup>HIGH</sup> (Vitelli-Avelar *et al.*, 2006). Este perfil puede ser útil para limitar la parasitemia y la infección a los tejidos.

Se ha demostrado que las células NK son importantes en la defensa contra la diseminación de la infección por el parásito. Representan una fuente importante de interferón gamma (INF $\gamma$ ), una citoquina clave para activar macrófagos y ayudar a la eliminación del parásito. En la fase indeterminada las células CD3<sup>-</sup>CD16<sup>+</sup>CD56<sup>+</sup> y CD3<sup>+</sup>CD16<sup>+</sup>CD56<sup>DIM</sup> se encuentran en mayor porcentaje que en pacientes con CCC, lo que sugiere que presentan un papel protector. Es posible que las células NK CD56<sup>DIM</sup> participen en la regulación negativa de la respuesta exacerbada de los linfocitos citotóxicos característica de los pacientes con CCC (González *et al.*, 2013).

Los monocitos muestran un perfil diferencial de citoquinas durante las fases de la enfermedad. Los pacientes indeterminados producen más IL-10 y los pacientes con CCC presentan altos valores de TNF $\alpha$  lo que favorece un perfil proinflamatorio que puede ser el responsable de la miocarditis crónica. La evaluación de la relación entre el perfil de expresión génica de IL-10 e INF $\gamma$  determinó que los pacientes en fase indeterminada muestran mayor expresión de INF $\gamma$  y la mayoría de pacientes con CCC leve tienen altos niveles de IL-10 (de Melo *et al.*, 2012). Por otra parte se ha demostrado que los pacientes en fase indeterminada muestran un desequilibrio en la capacidad de producción de citoquinas, bajo índice de fagocitos y altos niveles de óxido nítrico (NO). Dicha capacidad fagocítica se detecta por la reducción en la expresión de Fc $\gamma$ R, TLR y CR1 (Gomes *et al.*, 2012).

Los receptores tipo Toll (TLR) participan en la respuesta a la infección por *T. cruzi*. TLR2 fue el primer receptor identificado y reconoce glicofosfatidilinositol (GPI) anclado a glicoproteínas de tipo mucina distribuidas en la membrana celular del parásito (Campos *et al.*, 2001). Estudios *in vivo* e *in vitro* han demostrado que los macrófagos estimulados con GPI producen NO, TNF $\alpha$  e IL12 mediante la activación de los receptores TLR-2/CD14 (Campo *et al.*, 2004). TLR-2 reconoce la proteína

Tc52 e induce la activación de células dendríticas. TLR4 reconoce glicoinositol fosfolípidos que contienen ceramida GIPL y TLR9 reconoce DNA rico en secuencias CpG (González & Mantilla, 2012). El genotipo D299G/T399I deficiente de TLR-4 se encuentra con mayor frecuencia en pacientes asintomáticos, lo que sugiere que una menor activación de este receptor tiene un efecto protector (Weitzel *et al.*, 2012).

Las moléculas del sistema del complemento C1q, C3, lectina de unión a manano y ficolinas se han encontrado ligadas a todas las cepas del parásito analizadas. Los experimentos con depósitos de C3b y C4b indican que *T. cruzi* activa principalmente la vía de las lectinas y la vía alterna. Los tripomastigotes metacíclicos de algunas cepas son altamente susceptibles a la lisis mediada por el complemento mientras que otras cepas son resistentes (Cestari & Ramírez, 2010).

## **2.1.2 Inmunidad adaptativa**

### **2.1.2.1 Respuesta humoral**

Existe evidencia de que factores humorales participan en el control de la infección por *T. cruzi*. En ratones tratados con suero con altos títulos de anticuerpos se demostró que la subclase IgG2b tiene un efecto protector. Además ratones con deficiencia de linfocitos B inducida por inyección de anticuerpos anti-Ig presentan mayor susceptibilidad a la infección. Asimismo, mediante el estudio de lisis mediada por complemento se detectó un anticuerpo anti-tripomastigote contra una glicoproteína de 160kDa. De igual forma se encontró un anticuerpo isotipo IgM dirigido contra una proteína de 72kDa de la membrana celular del parásito (Teixeira *et al.*, 2011).

Por otra parte, se han descrito diferentes autoanticuerpos dirigidos contra componentes del endocardio, vasos sanguíneos y músculo esquelético. Por ejemplo el anticuerpo anti-laminina reacciona contra amastigotes, tripomastigotes y la proteína laminina en humanos. Se deposita en la membrana de miocitos y células endoteliales pero no se correlaciona con la severidad de la enfermedad (Milei, *et al* 1993). Además, los anticuerpos anti-miosina pueden inducir el desarrollo de

miocarditis en ratones inmunosuprimidos y cuando se transfieren a ratones no infectados causan desórdenes en la conducción cardiaca (Giordanengo, *et al*/2000). 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 & Mantilla, 2012). También la presencia de los autoanticuerpos puede deberse a la liberación de autoantígenos producto de la respuesta inmune frente al parásito (Cunna-Neto, 1995).

### **2.1.2.2 Inmunidad celular adquirida**

La inmunidad celular es importante para controlar las formas intracelulares del parásito. Su papel protector depende de las células T CD4<sup>+</sup> y CD8<sup>+</sup> productoras de INF $\gamma$  que limitan la infección. Una vez las células del sistema adaptativo reconocen los antígenos del parásito inducen la activación de los linfocitos T y su diferenciación.

El estudio de los linfocitos circulantes en sangre periférica de pacientes chagásicos muestra un incremento en el número y porcentaje de células doble positivas de fenotipo CD3<sup>+</sup>/HLA-DR, con disminución de células CD45RA<sup>+</sup>/CD4<sup>+</sup> y CD45RA<sup>+</sup>/CD8<sup>+</sup> indicando un mayor número de células T activadas (Dutra *et al.*, 1994).

Por otra parte, las células T CD4<sup>+</sup> de pacientes en fase indeterminada expresan en menor medida la molécula coestimuladora CD28 con altos niveles de molécula HLA-DR (Menezes *et al.*, 2004). Un estudio posterior demostró que estas células T CD4<sup>+</sup>CD28<sup>-</sup> muestran menor expresión de CTLA4. Este fenotipo celular se correlaciona con una mayor producción de IL-10 en pacientes indeterminados (Souza *et al.*, 2007). Así mismo en estos pacientes se encuentra un incremento de células Treg CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> con una disminución en los niveles de células CD8<sup>+</sup> activadas. Se sugiere que una expansión de estas células Treg puede ser benéfica, posiblemente mediante la limitación de la fuerte actividad citotóxica y daño al tejido.

El estado activado de las células Treg en pacientes indeterminados se propone basada en una menor expresión de CD62L y alta expresión de CD40L, CD69 y CD54. Consistente con estos hallazgos se encontró incremento en la frecuencia de la población de células CD4<sup>+</sup>CD25<sup>HIGH</sup>FOXP3<sup>+</sup> productoras de IL-10 en el grupo de indeterminados. Los pacientes con manifestaciones cardiacas muestran incremento del porcentaje de CD4<sup>+</sup>CD25<sup>HIGH</sup>FOXP3<sup>+</sup> que expresan CTLA-4. Estos datos sugieren que la IL-10 producida por las células Treg es efectiva en controlar el desarrollo de la enfermedad en pacientes indeterminados (de Araújo *et al.*, 2011).

También se ha investigado el papel de las células T doble negativas (DN) en la infección con *T. cruzi*. Se observó que las células T  $\alpha\beta$ DN producen citoquinas inflamatorias en la fase crónica de la enfermedad. Las células T  $\gamma\delta$ DN muestran un incremento significativo en la producción de IL-10 en los pacientes indeterminados. El número de células T  $\gamma\delta$ DN productoras de IL-10 se correlacionó positivamente con una mejor función cardiaca en los pacientes, sugiriendo un efecto protector en la enfermedad (Villani *et al.*, 2010).

En conclusión la coordinación de redes complejas de señalización que sirven de puente entre el sistema inmune innato y adaptativo repercute en la diferenciación celular hacia un perfil de respuesta particular. De esta manera, la EC se relaciona con la activación de proteínas que favorecen la inflamación y una reducción en la expresión de proteínas inmunoregulatoras (González & Mantilla, 2012).

## **2.2 Susceptibilidad genética a la enfermedad de Chagas**

Uno de los principales retos de la biología molecular es entender cómo las diferencias fenotípicas entre individuos están codificadas en sus genomas. Los polimorfismos de único nucleótido (SNP) son la forma más simple de variación en el DNA entre individuos. Comprenden más del 80% de todos los polimorfismos conocidos y se asume que son principalmente responsables de las diferencias fenotípicas entre individuos de la misma especie. Los SNPs pueden ser un tipo de transversión o transición y ocurren a través del genoma en una frecuencia cercana

a 1 cada 1000 pares de bases (bp). Pueden influir en la diversidad entre individuos, la evolución del genoma, la mayoría de rasgos familiares comunes, diferencias interindividuales en respuesta a medicamentos y enfermedades comunes y complejas como diabetes, obesidad, hipertensión y desórdenes psiquiátricos. Los SNPs pueden generar un cambio de aminoácido (no sinónimo), pueden ser silentes (sinónimos) o simplemente ocurrir en regiones no codificantes. Teniendo en cuenta que los SNPs influyen la actividad promotora (expresión génica), la conformación del mRNA (estabilidad) y la localización subcelular de mRNAs y/o proteínas, pueden desempeñar un papel importante en el desarrollo de enfermedades. La mitad de estas variantes ocurren en regiones no codificantes, 25% conducen a mutaciones sin sentido y el remanente 25% son mutaciones silentes. Estas últimas aunque no generan cambio de aminoácido se ha demostrado que pueden tener efecto en la función génica y en el fenotipo (Kwok, 2003). Dependiendo de la localización de un codón y el tipo de sustitución, es posible que se presenten cambios funcionales y estructurales en la proteína codificada y en consecuencia cambia el fenotipo. La identificación de numerosas variaciones en genes y el análisis de sus efectos permiten un mejor entendimiento de su impacto sobre la función del gen y la salud de los individuos.

La EC se considera una enfermedad compleja y poligénica. Los fenotipos clínicos complejos son el resultado de la interacción entre determinantes genéticos y no genéticos. Los factores genéticos se consideran los principales contribuyentes al fenotipo teniendo en cuenta que pueden heredarse. En un fenotipo complejo la medida del efecto de los alelos involucrados es variable, pocos alelos tendrán un gran efecto y un mayor número de alelos aportarán efectos pequeños. Mediante la influencia en la expresión génica, la estructura de la proteína y la función, las variantes pueden afectar diferentes rutas biológicas impactando en la susceptibilidad a una enfermedad compleja (Marian, 2012). De esta manera los SNPs han sido usados en estudios de asociación por su posible papel en la patogénesis de diversas enfermedades complejas y poligénicas mejorando la comprensión del efecto del genoma sobre el fenotipo.

Los mecanismos que conducen a la progresión de la CCC aún no están completamente entendidos. Se sugiere que existe un componente genético de susceptibilidad a la enfermedad, importante porque sólo alrededor de la tercera parte de los pacientes infectados desarrollan la patología (Ayo *et al.*, 2013). En este sentido se han llevado a cabo estudios genéticos de casos y controles para encontrar asociaciones entre variantes genéticas y progresión de la enfermedad e infección (Tabla 2). Los genes de la respuesta inmune fueron los primeros candidatos en ser estudiados debido al importante papel de la inflamación en la patogénesis de la enfermedad. Estos resultados han logrado demostrar la influencia de los factores genéticos del hospedero en la susceptibilidad o resistencia al desarrollo del fenotipo de la CCC.

**Tabla 2. Polimorfismos genéticos estudiados en la enfermedad de Chagas**

Gen	Polimorfismo	Población	Asociación	Referencia
HLA	HLA-DR4, HLA-B40, DQB1, DRB1	Chile, Brasil, Perú, Méjico, Argentina, Bolivia	Controvertida	Deghaide <i>et al</i> 1998, De Oliveira <i>et al</i> 2002, Nieto <i>et al</i> 2000 Cruz-Robles <i>et al</i> 2004, Borrás <i>et al</i> 2006, del Puerto <i>et al</i> 2012
NOS2	(CCTTT) <sub>n</sub>	Perú	Negativa	Calzada <i>et al</i> 2002
NRAMP1	(5'(GT) <sub>n</sub> , A236 C»T, D543N, y delección 3'UTR	Perú	Negativa	Calzada <i>et al</i> 2001
Cadena pesada de la β-miosina	(CATT) <sub>n</sub>	Brasil	Negativa	Faé <i>et al</i> 2000
TNFα	(-1031T/C); -308G/A	Colombia	Cardiomiopatía	Criado <i>et al</i> 2012
TNFα	-308G/A -28G/A	Perú	Negativa	Beraún <i>et al</i> 1998
TNFα	-308G/A -238G/A	Méjico	Cardiomiopatía -308G/A	Rodríguez-Pérez <i>et al</i> 2005
TNFα	-308 G/A	Brasil	Negativa	Drigo <i>et al</i> 2007
TNFα	-308G/A -238G/A	Brasil	Susceptibilidad -238G/A	Pissetti <i>et al</i> 2011

<b>Gen</b>	<b>Polimorfismo</b>	<b>Población</b>	<b>Asociación</b>	<b>Referencia</b>
TLR2	Arg756Gln	Colombia	Negativa	Zafra <i>et al</i> 2008
TLR4	Asp299Gly Thr399Ile	Colombia	Negativa	Zafra <i>et al</i> 2008
LTA	+80A/C +252A/G	Brasil	Cardiomiopatía	Ramasawmy <i>et al</i> 2007
IL1RN	+11100T/C	Méjico	Susceptibilidad y Cardiomiopatía	Cruz-Robles <i>et al</i> 2009
IL1B	+5810G/A	Colombia	Cardiomiopatía	Flórez <i>et al</i> 2006
BAT1	-348C/T -22C/G	Brasil	Cardiomiopatía	Ramasawmy <i>et al</i> 2006
MCP1	-2518α/G	Brasil	Cardiomiopatía	Ramasawmy <i>et al</i> 2006
IL12β	+1188A/C	Colombia	Cardiomiopatía	Zafra <i>et al</i> 2007
TGFβ1	+10T/C	Perú y Colombia	Susceptibilidad	Calzada <i>et al</i> 2009
IL-10	-1082 G/A	Brasil	Cardiomiopatía	Costa <i>et al</i> 2009
MIF	-173G/C	Perú y Colombia	Susceptibilidad	Torres <i>et al</i> 2010
IL-6	-174G/C	Perú y Colombia	Negativa	Torres <i>et al</i> 2010
INF-γ	+874T/A	Colombia	Susceptibilidad	Torres <i>et al</i> 2010
IL-4	-509C/T	Bolivia	Susceptibilidad	Arnez <i>et al</i> 2011
CCL2	-2518AA	Brasil	Cardiomiopatía	Ramasawmy <i>et al</i> 2006
CCR5	rs3176763	Brasil	Susceptibilidad C/A Protección C/C	Frade <i>et al</i> 2013
CCR5	rs11575815	Brasil	Susceptibilidad	Frade <i>et al</i> 2013
CCR5	rs1799988C	Brasil	Susceptibilidad	Nogueira <i>et al</i> 2012
CCR5	-2733G -2554T	Colombia	Protección	Flórez <i>et al</i> 2012
CCR5	59029G/HHA	Colombia	Susceptibilidad y cardiomiopatía	Flórez <i>et al</i> 2012
CCR5	rs1800024/HHF*2	Colombia	Cardiomiopatía	Machuca <i>et al</i> 2014
CCR5	rs2734648/ rs1800023/ HHC	Colombia	Protección	Machuca <i>et al</i> 2014
CCR5	rs1799987	Venezuela	Protección	Fernández- Mestre <i>et al</i> 2004
CCR5	rs1799987 G/AG	Perú	Protección	Calzada <i>et al</i> 2001
CCR5	rs333 rs1799987	Brasil	Negativa	Oliveira <i>et al</i> 2014
CCR5	rs1799987	Brasil	Susceptibilidad a CCC y formas digestivas	de Oliveira <i>et al</i> 2015

<b>Gen</b>	<b>Polimorfismo</b>	<b>Población</b>	<b>Asociación</b>	<b>Referencia</b>
CCR2	rs1799864	Colombia	Cardiomiopatía	Machuca <i>et al</i> 2014
FOXO3	rs12212067	Colombia	Negativa	Rodríguez <i>et al</i> 2016
IL-18	rs187238 rs360719 rs2043055 rs1946518	Colombia	Infección	Rodríguez <i>et al</i> 2016
IL-18	rs2043055	Brasil	Cardiomiopatía	Nogueira <i>et al</i> 2015
ADAM12	rs11244787 rs1871054	Argentina, Bolivia y Paraguay	Susceptibilidad a infección congénita	Juiz <i>et al</i> 2016
MMP2	rs243866 rs17859821 rs2285053	Argentina, Bolivia y Paraguay	Susceptibilidad a infección congénita	Juiz <i>et al</i> 2016
IL17A	rs8193036	Colombia	Protección	Rodríguez <i>et al</i> 2015
Galectina-3	rs4644 rs4652	Brasil	Negativa	Cruz <i>et al</i> 2015
MICA	-129	Brasil	Cardiomiopatía	Ayo <i>et al</i> 2015
ACTC1	rs640249	Brasil	Cardiomiopatía	Frade <i>et al</i> 2013
CTLA-4	-1722	Brasil	Protección	Dias <i>et al</i> 2013
CTLA-4	-318	Brasil	Formas cardiaca y digestiva	Dias <i>et al</i> 2013
FCN2	A258S	Brasil	Formas cardiaca y digestiva	Luz <i>et al</i> 2013
CXCL9	rs10336	Brasil	Protección	Nogueira <i>et al</i> 2012
CXCL10	rs3921	Brasil	Protección	Nogueira <i>et al</i> 2012
MAL/TIRAP	S180L	Brasil	Protección	Ramasawmy <i>et al</i> 2009
MASP2	g.1961795C, p.371D	Brasil	Cardiomiopatía	Boldt <i>et al</i> 2011
Haptoglobina	Hp 1-1	Brasil	Cardiomiopatía	Jorge <i>et al</i> 2010
PTPN22	C1858T	Perú	Negativa	Robledo <i>et al</i> 2007
C3	C3F	Brasil	Susceptibilidad	Messias-Reason <i>et al</i> 2003

Tomado y modificado de Ayo *et al* 2013

### 2.3 Estudios de expresión

Los polimorfismos genéticos pueden influir en el nivel de expresión de una proteína, por lo cual tendrían un carácter funcional que explicaría en parte la asociación de

genes importantes en la patogénesis de la EC. El perfil transcriptómico frente a la infección por *T. cruzi* se ha estudiado en diferentes modelos. A partir de 2003 se adelantaron los primeros estudios de expresión global en respuesta a la presencia del parásito. Garg *et al.*, infectaron ratones de la cepa C3H/HeN con tripomastigotes de Silvio X10 y compararon la expresión en miocardio con ratones no infectados en 3, 37 y 110 días post-infección (dpi). El miocardio de ratones infectados mostró un aumento en la expresión de genes de respuesta inmune como *INF-γ*, *IL-1*, *IL-6*, *TNF-α*, *MIG*, *SCY2*, *CCR2*, *CCR5* y factores reguladores de INF (*IRF1*, *IRF2*). Algunas proteínas estructurales como colágeno, fibronectina, trombospondina 2 y osteoglicina se encontraron elevadas, al igual que el péptido natriurético atrial y otros marcadores de hipertrofia. Por el contrario, los transcritos codificantes de citocromo oxidasa C y NADH ubiquinona oxidoreductasa experimentaron una reducción dramática (Garg *et al.*, 2003). Posterior a este trabajo, los investigadores desarrollaron un arreglo que incluyó 95 genes específicos de mitocondria (Garg *et al.*, 2004). Empleando el diseño del estudio anterior determinaron un aumento en genes relacionados con la beta oxidación de los ácidos grasos. Además lograron reproducir sus hallazgos previos observando disminución en la expresión de genes del ciclo del ácido tricarbóxico y la cadena respiratoria. Estos resultados indican una pérdida en la capacidad de producción de energía en el tejido cardíaco (Garg *et al.*, 2004). Más tarde, se publican dos estudios de expresión génica en miocardio de ratones infectados con *T. cruzi* reportando resultados concordantes con las primeras investigaciones. Mukherjee *et al.*, evidenciaron aumento en la expresión de mediadores de la respuesta inmune CMH clase II, *CCR5*, *CCR4*, *IL16*, *IL4* e *IL12*. Conjuntamente se mostró incremento en factores de crecimiento de fibroblastos, *TGFβ-2* y factor de crecimiento epidérmico *EGF* (Mukherjee *et al.*, 2008). Por su parte Soares *et al.*, establecieron un aumento significativo de genes relacionados con citoquinas y respuesta inmune, como *Tnfrsf1b*, *CCL2*, *CCL8*, *CCL7/MCP3*, *CXCL12*, *IRF1* e *IRF2*, *CFB*, antígeno CD52 y CD38. Mientras que genes involucrados en actividad catalítica y oxidoreductasa, transporte de electrones y

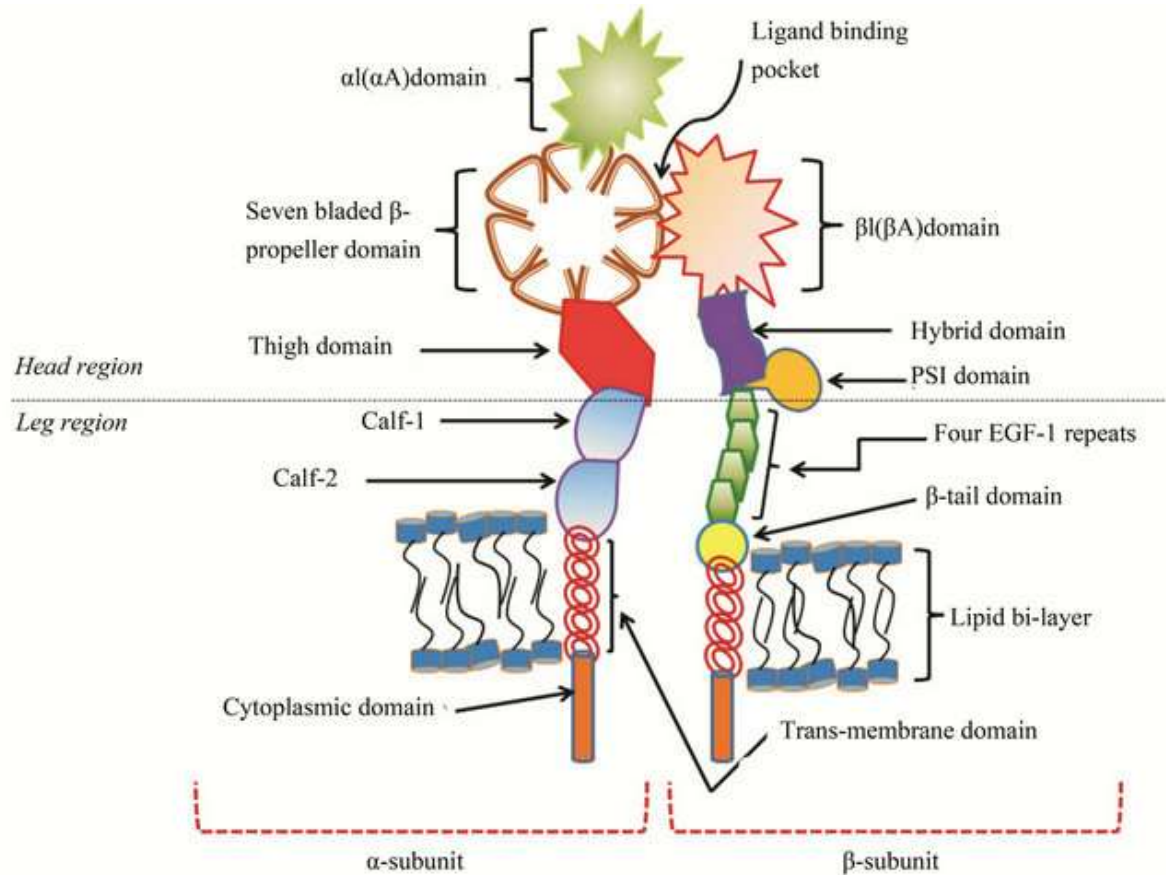
metabolismo de carbohidratos presentaban bajos niveles de mRNA en el tejido infectado (Soares *et al.*, 2010).

A nivel celular se estudió la expresión en cardiomiocitos murinos infectados y se detectaron alteraciones en los genes de respuesta inmune. Sin embargo, *CXCL12* se halló disminuido, contrario a lo que habían mostrado investigaciones previas. Las proteínas inhibitorias de la apoptosis *Birc1b* y *Birc5* tenían expresión disminuida, mientras el supresor tumoral *Axud1* y el factor de iniciación *Eif5a* se encontraron aumentados. En la vía de señalización del calcio, se observó disminución de la calmodulina y las proteínas de interacción con calcineurina, *Dscr1* y *Dscr1L*. Los genes del citoesqueleto y proteínas de adhesión presentaron disminución (Dos Santos *et al.*, 2009). Costales *et al* investigaron la expresión diferencial en fibroblastos de prepucio humano, células de músculo liso vascular y células endoteliales microvasculares humanas infectadas con *T. cruzi*. Para los tres tipos celulares se reportó un aumento en la expresión de genes estimulados por interferón (ISGs), como exonucleasa (*ISG20*), 2,5-oligoadenilato sintasa (*OAS1*). Se evidenció aumento del factor de crecimiento de fibroblastos (*FGF*), factor de crecimiento endotelial vascular (*VEGF*) y factor de crecimiento derivado de plaquetas (*PDGF*). Asimismo, la infección indujo fuerte expresión de *IFN $\beta$*  y *CCL5*, genes de matriz extracelular y transporte vesicular (*SYTL3*, *T-SNARE1*, *STIM1* y *CARKL*) (Costales *et al.*, 2009). En resumen las investigaciones dirigidas en infección experimental con *T. cruzi*, han logrado determinar la existencia de un perfil de expresión diferencial caracterizado por un aumento en los niveles de genes de respuesta inmune y disminución en el metabolismo energético celular.

### **3. Integrinas**

Las integrinas comprenden una familia de receptores de adhesión celular heterodiméricos que se expresan en la mayoría de células y están involucradas en distintas funciones celulares. Están compuestas de una unidad  $\alpha$  y una unidad  $\beta$ , cada una de las cuales atraviesa la membrana celular con un dominio extracelular

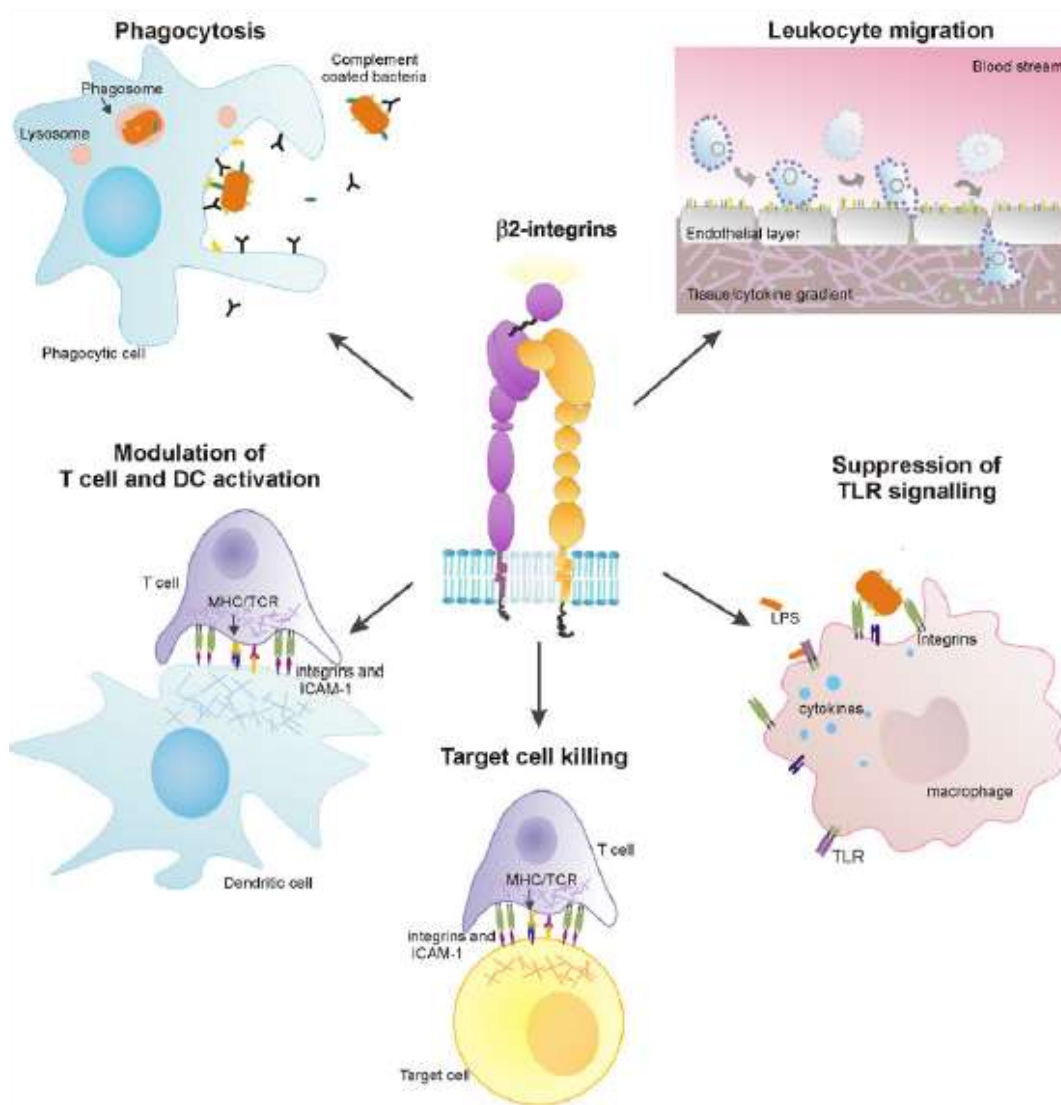
largo, una región transmembrana y una cola corta citoplasmática (Figura 5) (Lim & Hotchin, 2012).



**Figura 5.** Representación del heterodímero de integrinas. Tomado de Goswami, 2013.

Se han identificado 18 cadenas  $\alpha$  y 8 cadenas  $\beta$  en humanos y juntas forman 24 heterodímeros diferentes, los cuales pueden unir una variedad de ligandos. La familia de integrinas  $\beta 2$  comprende cuatro heterodímeros de glicoproteínas funcionales,  $\alpha L\beta 2$  (CD11a/CD18; LFA-1),  $\alpha M\beta 2$  (CD11b/CD18; MAC-1),  $\alpha X\beta 2$  (CD11c/CD18), y  $\alpha D\beta 2$  (CD11d/CD18) (Cambi *et al.*, 2000). Estas integrinas participan en diferentes procesos celulares y juegan un papel clave en la adhesión de neutrófilos (Figura 6). CD11a y CD11b se expresan constitutivamente en la superficie de la mayoría de los leucocitos. CD11b/CD18 y CD11c/CD18 son almacenadas en gránulos y pueden ser rápidamente movilizadas a la superficie de

los leucocitos. Después de la activación de los leucocitos, CD11b/CD18 se desplaza a la superficie celular mientras que CD11a/CD18 alcanza un alto estado de actividad debido a los cambios conformacionales en la glicoproteína. Estos cambios en la cantidad y en la aidez de CD11/CD18 sobre la superficie de los leucocitos, permiten una fuerte interacción de la molécula de adhesión con su receptor (por ejemplo CD11a/CD18 a ICAM-1 o ICAM-2) (Granger & Senchenkova, 2010).



**Figura 6.** Procesos celulares que involucran la participación de integrinas  $\beta 2$ . Tomado de MacPherson, M. (2013).

### 3.1 Integrina M ( $\alpha M\beta 2$ )

La integrina M o receptor fagocítico  $\alpha M\beta 2$  es también denominado receptor 3 del complemento CR3, antígeno de macrófago 1 Mac-1 o CD11b/CD18. Mac-1 se expresa en monocitos, granulocitos, macrófagos y células NK. Participa en diferentes funciones como fagocitosis, muerte mediada por células, quimiotaxis, activación celular, apoptosis y degranulación (Figura 6). Funciona como una molécula de adhesión que media la diapédesis de leucocitos y como receptor del fragmento iC3b del complemento responsable de la degranulación y fagocitosis en respuesta a microorganismos (Lim & Hotchin, 2012). Debido a su capacidad de mediar la adhesión leucocitaria y la migración juega un papel central en la inflamación. Otra de sus funciones claves es la capacidad de formar complejos de membrana con receptores anclados a glicofosfatidilinositol tales como Fc $\gamma$ RIIIB (CD16b) o uPAR (CD87) (Figura 7). De esta manera proporciona un mecanismo de señalización transmembrana que permite la adhesión dependiente de citoesqueleto o la fagocitosis y degranulación (Ross, 2000). La asociación de Mac-1 con Fc $\gamma$ RIIIB activa mecanismos de señalización mediados por calcio, producción de especies reactivas de oxígeno y fagocitosis dependiente de anticuerpo en neutrófilos humanos (Figura 7). La unión de la forma soluble de este receptor con Mac-1 induce la liberación de citoquinas proinflamatorias en neutrófilos (IL-8) y monocitos (IL-8 e IL-6) (Roseti & Mayadas 2016).

Mac-1 reconoce diferentes ligandos como fibrinógeno (Fg), componente 3b inactivo del complemento (iC3b), ICAM-1, factor inhibitorio del neutrófilo en anquilostomas, factor X de la coagulación sanguínea y proteínas denaturadas (Solovjo *et al.*, 2005). Tiene muchas características compartidas con otras integrinas, incluso señalización bidireccional mediante cambios conformacionales que se originan ya sea en el dominio citoplasmático o en la región extracelular. Muchas funciones dependen de un sitio de lectina próximo a la membrana responsable del reconocimiento de cualquier polisacárido de superficie microbiana o de patrones de señalización unidos a GPI (Ross, 2000).

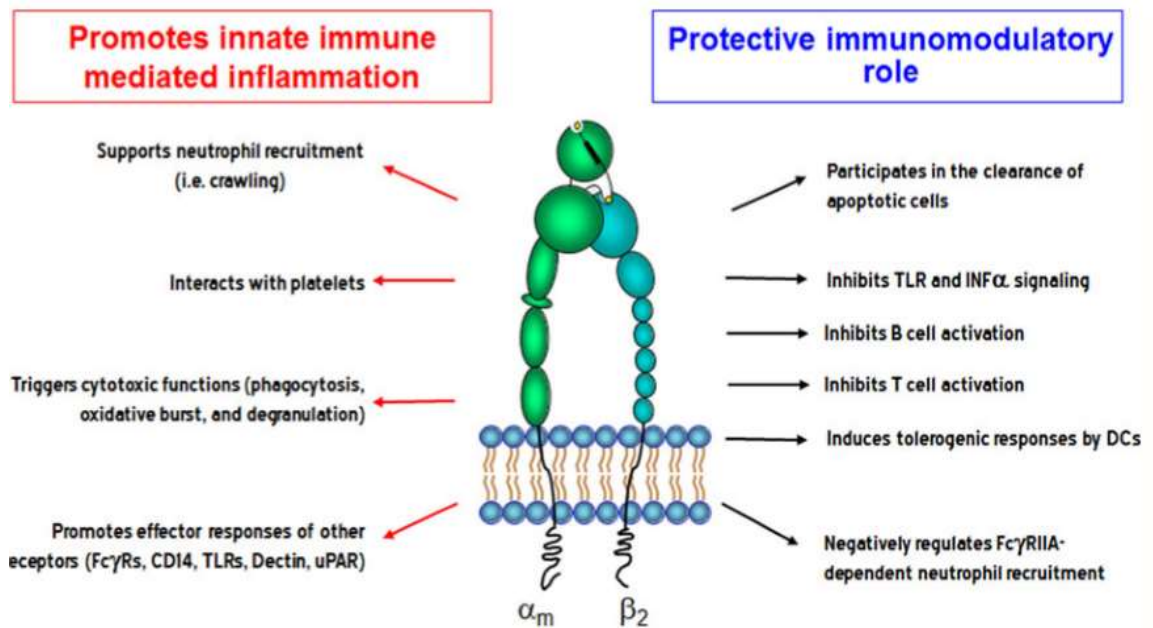
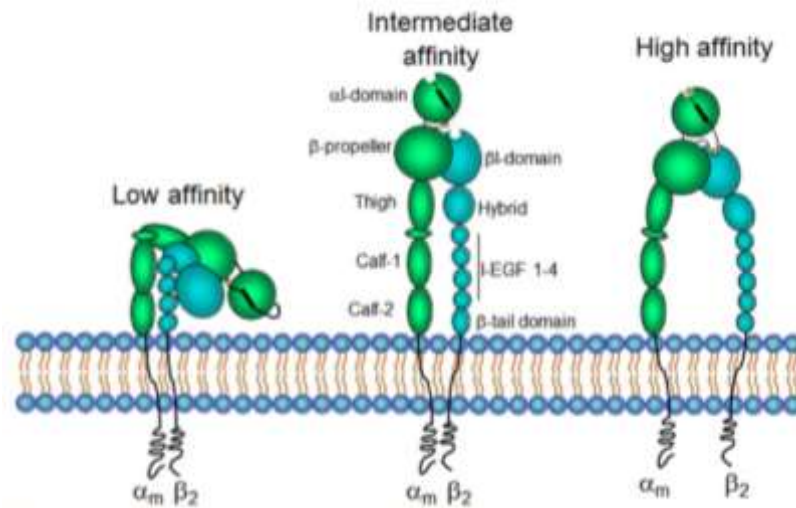


Figura 7. Funciones pro-inflamatoria y anti-inflamatoria de Mac-1. Tomado de Rosetti & Mayadas 2016.

La mayoría de integrinas incluido Mac-1 se encuentran en estado de reposo y pueden ser activadas por estímulos externos para producir un estado de unión a ligando de alta afinidad. En el estado inactivo hay una asociación estrecha, entre la región transmembrana y citoplasmática de las subunidades de las integrinas con el dominio extracelular doblado hacia la membrana celular. Después de la activación los dominios extracelulares se presentan erguidos y las dos subunidades se separan en la región transmembrana y en la cola citoplasmática (Figura 8). Las interacciones débiles entre estas regiones son indispensables para mantener la integrina en estado de reposo, mientras que en la activación completa se observa la separación de las subunidades a nivel de estas regiones (Lim & Hotchin, 2012). La conservación de la estructura de la integrina es indispensable para generar una activación eficiente durante su interacción con ligandos.

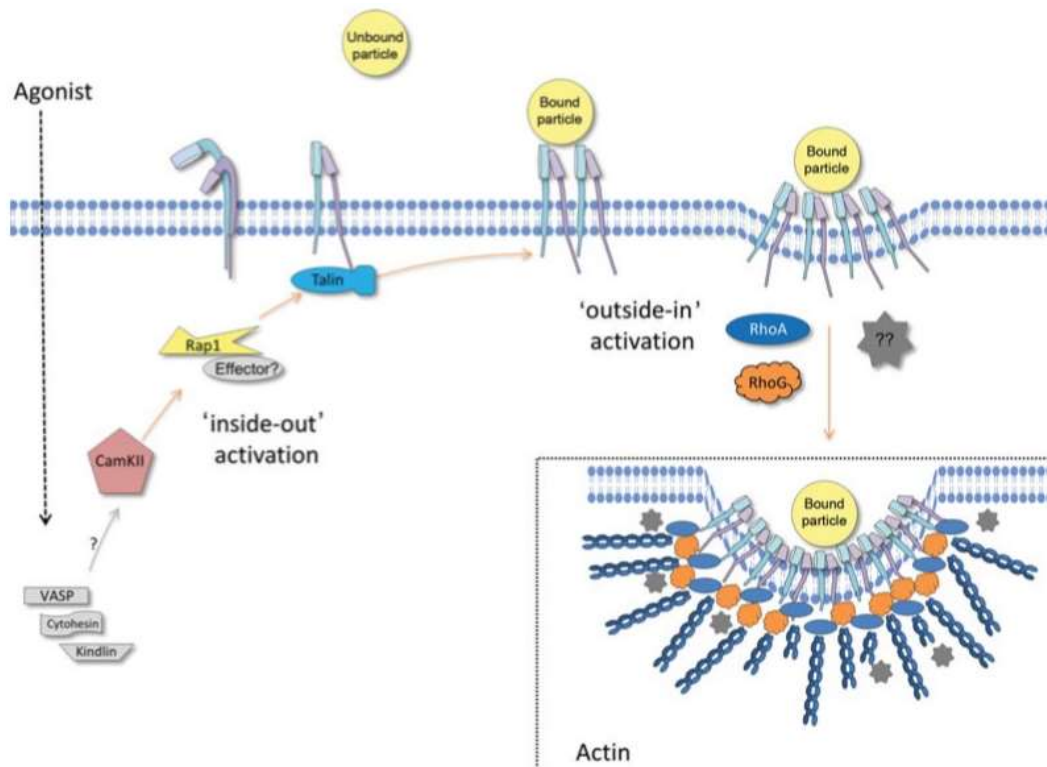


**Figura 8.** Activación de Mac-1. Tomado de Rosetti & Mayadas 2016

### 3.1.1 Procesos de señalización para la activación de Mac-1

#### a. Mac-1, RAP-1 y talin

Durante el proceso de fagocitosis Mac-1 induce una vía de señalización a través de la cola citoplasmática que conduce a un incremento en la afinidad por una partícula opsonizada. La interacción entre la partícula y la integrina termina en la captura de la partícula. Diferentes moléculas participan en la activación *inside-out* mediada por Mac-1 incluidas Rap-1, Talin 1 y CamKII (Figura 9). Rap-1 es una pequeña proteasa involucrada en la activación de muchas integrinas. Talin presenta dos isoformas y es una proteína del citoesqueleto de alto peso molecular compuesta de un dominio N- terminal que contiene un motivo FERM (proteína 4.1, ezrin, radixin y moesin). Talin interactúa con la cola citoplasmática de muchas β integrinas y puede por sí sola conducir a la activación de las integrinas. CamKII es una serina-treonina quinasa dependiente de calcio calmodulina. Se conoce que regula la expresión génica, el tráfico de membrana, la secreción, la dinámica del citoesqueleto, y la fagocitosis de células tumorales apoptóticas (Lim & Hotchin, 2012).



**Figura 9.** Señalización bidireccional de Mac-1 en macrófagos. La activación de la integrina permite la unión de la célula con la partícula opsonizada. Tomado de Lim, J. 2012.

### b. Mac-1 y quinasas

Diferentes quinasas y fosfatasa están implicadas en la activación *inside-out* de las integrinas  $\beta 2$ . Estas incluyen la proteína quinasa C (PKC) y A (PKA), la quinasa de cadena liviana de la miosina (MLC) y la fosfatasa de la cadena liviana de la miosina. Se han identificado fosforesiduos en la cadena  $\beta 2$  incluidos S745, S756 y T758. El residuo S756 determina el reclutamiento local de Talin y es fosforilado por una molécula asociada a calmodulina. Se sugiere que CamKII fosforila S756 y permite que Rap-1 y Talin sean reclutados para la activación de Mac-1 (Lim & Hotchin, 2012).

### **c. Señalización por fosfoproteínas y GEFs**

Algunas investigaciones han reportado que moléculas derivadas de bacterias pueden activar Mac-1 a través de VASP y citohesina-1. La citohesina-1 es un factor de intercambio de nucleótidos de guanina miembro de la familia Arf de pequeñas GTPasas. VASP participa en la adhesión celular y en la dinámica del remodelamiento del citoesqueleto. Las dos proteínas son reguladores negativos de Mac-1 y un aumento en la expresión de citohesina-1 produce una menor expresión y activación de la integrina (Lim & Hotchin, 2016).

### **d. Eventos de *ruffling* en la membrana celular**

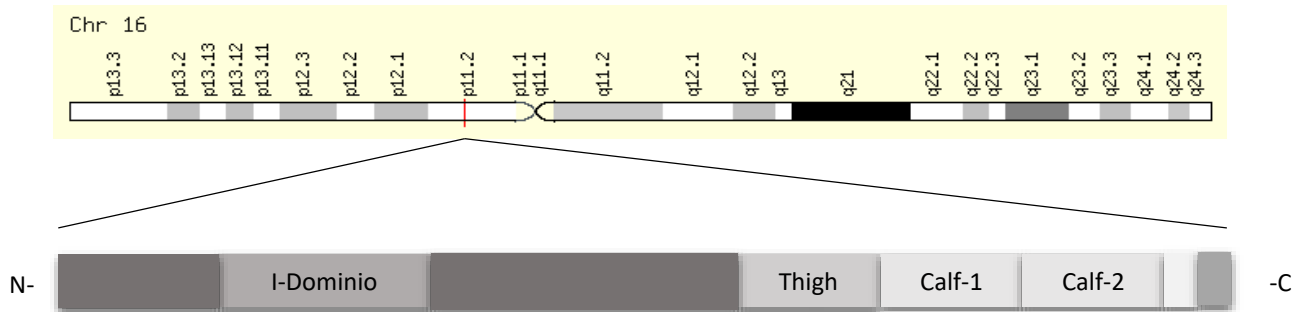
Estos eventos consisten en el agrupamiento de integrinas y el plegamiento de la membrana, ambos ocurren de una manera independiente de ligando en macrófagos después del tratamiento con PMA o LPS. Esta forma de agrupar integrinas ocurre a través de las colas citoplasmáticas. El agrupamiento extracelular de integrinas de monocitos conduce a diferentes efectos como la expresión del factor de transcripción Foxp1, el marcador de diferenciación de células mieloides PKC $\delta$  y la subsecuente diferenciación de monocitos y macrófagos. El plegamiento de la membrana involucra un conjunto diferente de moléculas de citoesqueleto y señalización incluyendo microtúbulos, CLIP-170, quinesina y Rab11 (Lim & Hotchin, 2012).

### **e. Señalización *outside-in***

Implica la activación de pequeñas GTPasas como RhoA y RhoG para captar una partícula durante la fagocitosis. Este tipo de señalización también favorece la unión de proteínas 14-3-3 que interactúan con Rac-1, GEF y TIAM para activar Rac-1. La activación de Rac-1 conduce al remodelamiento del citoesqueleto necesario para la adhesión celular y la migración (Lim & Hotchin, 2016).

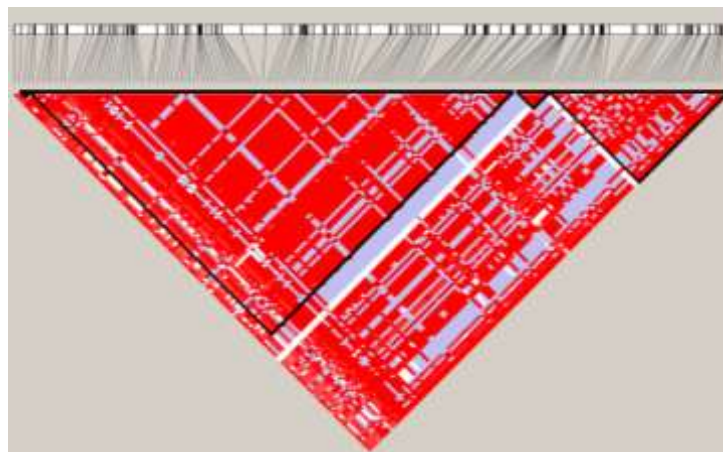
#### 4. Gen *ITGAM*

El gen *ITGAM* codifica para la cadena alfa de la integrina M (CD11b), la cual se ensambla con la cadena beta 2 (ITGB2) para formar la integrina conocida como receptor 1 del macrófago Mac-1. *ITGAM* se ubica en el brazo corto del cromosoma 16 (16p11.2) (Figura 10) y codifica una proteína de 127 kD (GeneCards).



**Figura 10.** Localización y estructura del gen *ITGAM*.

*ITGAM* tiene un tamaño de 72 Kb y lo conforman 30 exones y 3.459 nucleótidos. Presenta 36 diferentes intrones y la transcripción produce 12 mRNA diferentes, hay 7 probables promotores alternativos y 7 sitios de poliadenilación alternativos validados (NCBI, Aceview). El proyecto 1000 genomas reportó 357 variantes para el gen en población colombiana. La figura 11 muestra el mapa de desequilibrio de ligamiento (DL) del gen evidenciando cuatro bloques con alto DL.



**Figura 11.** Mapa de desequilibrio de ligamiento del gen *ITGAM*. Tomado de Haploview 4.2



A su vez el rs1143679 se ha encontrado asociado a diversos desórdenes autoinmunes como artritis reumatoide y esclerosis sistémica (Anaya *et al.*, 2012).

#### **4.2 ITGAM y la enfermedad de Chagas**

En los últimos años se ha investigado el papel de las células que expresan el marcador CD11b en el desarrollo de la EC. Portella *et al* usaron un modelo murino para evaluar la progresión de la forma indeterminada a la forma cardíaca. Se encontró un incremento significativo en células dendríticas intersticiales (IDCs) que expresan el marcador CD11b. Los resultados de este estudio sugieren que las IDCs participan en mecanismos regulatorios de hipersensibilidad retardada en respuesta a la infección por *T. cruzi* (Portella *et al.*, 2013).

Un análisis de expresión de moléculas de superficie (CD11b and HLA-DR) en monocitos CD14<sup>+</sup> y CD14<sup>-</sup> de pacientes infectados con *T. cruzi* encontró disminución significativa de CD11b (Souza *et al.*, 2004). Se ha sugerido que CD11b tiene un papel importante en la infección de células por tripanosomátidos. Un estudio en *L. major* concluyó que Mac-1 (CD11b) y CR1 pueden cooperar para mediar la adhesión eficiente de promastigotes opsonizados por el complemento a células que expresan ambos receptores. En macrófagos derivados de monocitos humanos, CD11b parece tener una contribución cuantitativamente mayor a esta adhesión que CR1. El bloqueo de Mac-1 disminuye la adhesión de los promastigotes metacíclicos de una manera más fuerte que el bloqueo de CR1 (Rosenthal *et al*, 1996). La disminución en la expresión de CD11b puede representar un mecanismo por el cual el parásito conduce a una menor efectividad en la activación de células T. Esto es soportado por estudios previos que demuestran la importancia de CD11b en la mediación de las interacciones macrófago-célula T (Souza *et al.*, 2004).

## 5. JUSTIFICACIÓN

La EC es considerada una de las más importantes enfermedades tropicales en América Latina, con pérdidas económicas de 1,2 billones de dólares al año basado en los años de vida ajustados por discapacidad (AVAD). La carga de la enfermedad de Chagas se considera cinco veces superior a la malaria y un quinto a la de VIH/SIDA en América Latina y el Caribe (Hotez *et al.*, 2013).

En Colombia se estima que cerca de 1.200.000 personas se encuentran infectadas por *Trypanosoma cruzi*, mientras que 8.000.000 están en riesgo de adquirir la infección. En la región oriental del país se ha determinado que aproximadamente 37.500 niños estarían infectados, cifra preocupante si se tiene en cuenta que 4 a 8% de las mujeres infectadas pueden transmitir la enfermedad por vía transplacentaria, por lo tanto, en América se esperaría que nazcan 15.000 niños con Chagas congénito (INS, 2014).

Un 10 a 30% de los pacientes infectados crónicamente desarrolla CCC, o síndromes digestivos como megacolon o megaesófago. La CCC es la principal manifestación clínica de la enfermedad en Colombia, aunque, hasta el momento no existe un consenso sobre los mecanismos que conducen al desarrollo de la misma. Se conoce que la inflamación juega un papel importante en la patogénesis de la enfermedad, por lo cual se han estudiado polimorfismos en genes de respuesta inmune y asociados a inflamación crónica (Tabla 2). Sin embargo, el papel de estos polimorfismos en la patogénesis de la CCC es desconocido. A pesar de que se ha establecido una clara asociación entre el genotipo del polimorfismo y la enfermedad, no se ha logrado determinar si la variable es la responsable directa y cómo influye en el fenotipo, o si es una variante que está en desequilibrio de ligamiento con la variante asociada.

Por otra parte, estudios de expresión génica en células humanas infectadas con *T. cruzi*, han demostrado que la respuesta a la infección, induce aumento en la expresión de genes de respuesta inmune y una regulación a la baja de genes del

metabolismo energético. Estos estudios no han incluido comparaciones entre células del sistema inmune de sujetos asintomáticos y pacientes con CCC, el cual es un enfoque que está siendo investigado por el Grupo de Inmunología y Epidemiología Molecular de la UIS. Los resultados derivados de estos experimentos, permitieron identificar genes candidatos relevantes en la patogénesis de la CCC. Por este motivo, el presente trabajo seleccionó como gen candidato, uno de los que presentó mayor expresión diferencial entre pacientes infectados con *T. cruzi*, en estadio asintomático y sintomático de la enfermedad de Chagas. Mediante este enfoque, se analizó el gen *ITGAM* con relevancia demostrada en el desarrollo y patogénesis de la enfermedad.

La identificación de variantes asociadas con susceptibilidad o resistencia al desarrollo de la CCC permite proponerlas como marcadores de progresión clínica y severidad de la enfermedad. Por otra parte, el conocimiento de la relación existente entre factores genéticos del hospedero y el fenotipo de la CCC, conducirá a un mejor entendimiento de la patogénesis de la enfermedad. Este aspecto constituye el punto de partida para la identificación de blancos terapéuticos que podrían ser utilizados como moduladores para evitar la progresión o desarrollo de la CCC.

## **6. OBJETIVOS**

### **OBJETIVO GENERAL**

Identificar variantes en un gen candidato con expresión génica diferencial y su asociación con cardiomiopatía chagásica crónica.

### **OBJETIVOS ESPECÍFICOS**

- Determinar un gen candidato con expresión diferencial asociado a cardiomiopatía chagásica crónica y sus polimorfismos.
- Determinar el desequilibrio de ligamiento de los polimorfismos del gen candidato para la selección de las variantes informativas.
- Determinar las frecuencias alélicas y genotípicas de las variantes genéticas seleccionadas en los grupos de pacientes asintomáticos y con cardiomiopatía chagásica crónica.
- Establecer asociación de los polimorfismos con el desarrollo de cardiomiopatía chagásica crónica.

## 7. MATERIALES Y MÉTODOS

### 7.1 Población de estudio

Se realizó un estudio de casos y controles que incluyó muestras de hombres y mujeres provenientes de áreas endémicas del departamento de Santander con serología positiva para anticuerpos contra *Trypanosoma cruzi*. De acuerdo a la clasificación de la OMS para evaluar la gravedad de la infección chagásica los pacientes asintomáticos se distribuyeron en la fase I y los sintomáticos en las fases II, III y IV.

Se analizaron 4 polimorfismos del gen *ITGAM* ubicado en el cromosoma 16 en la posición 16p11.2 (31.271.311 – 31.344.213).

#### 7.1.1 Casos

Criterios de inclusión

- Pacientes mayores de 18 años.
- Pacientes con serología positiva para anticuerpos contra *T. cruzi*.
- Pacientes que hayan firmado el consentimiento para el almacenamiento de sus muestras y su uso en estudios genéticos de la enfermedad de Chagas.
- Sujetos que hayan residido por más de 10 años en zonas endémicas de la enfermedad.
- Individuos con alteraciones clínicas y electrocardiográficas compatibles con cardiomiopatía chagásica.

Criterios de exclusión

- Diagnóstico de cardiopatía de origen no chagásico (cardiopatía dilatada idiopática, viral, isquémica).
- Enfermedades autoinmunes.
- Sujetos que no firmaron la autorización para el almacenamiento de sus muestras en investigaciones futuras.

### **7.1.2 Controles**

#### Criterios de inclusión

- Pacientes mayores de 18 años.
- Pacientes con serología positiva para anticuerpos contra *T. cruzi*.
- Ausencia de alteraciones electrocardiográficas compatibles con cardiomiopatía chagásica.
- Residentes en zonas endémicas por más de 10 años con características socioeconómicas similares a los casos.

#### Criterios de exclusión

- Enfermedades autoinmunes.
- Sujetos que no hayan autorizado el almacenamiento de sus muestras para investigaciones futuras.

### **7.2 Identificación de un gen con expresión diferencial**

Los resultados obtenidos de microarreglos realizados a partir de células de sangre periférica de pacientes sintomáticos y asintomáticos, 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”, mostraron el gen *ITGAM* con diferencia estadística en expresión.

### **7.3 Selección de polimorfismos**

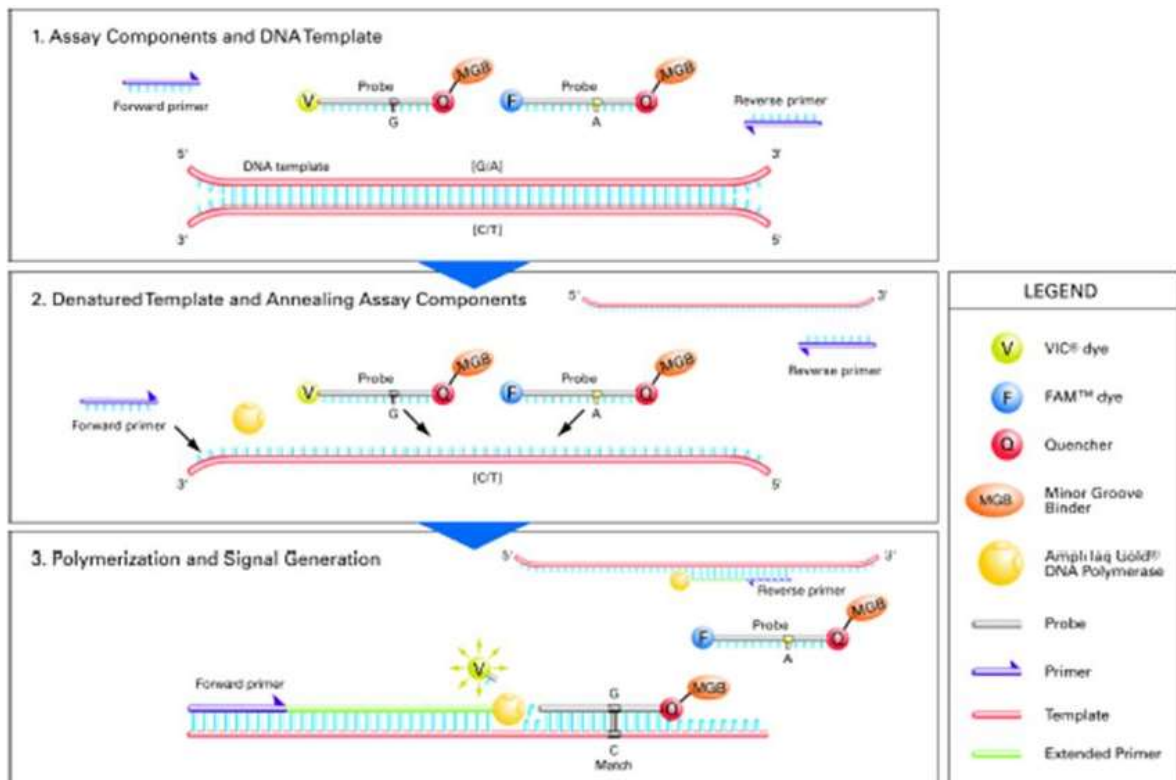
Se realizó la selección de tagSNPs con una frecuencia alélica mínima (MAF)  $\geq 0.1$  y desequilibrio de ligamiento con coeficiente  $r^2 \geq 0.80$ , usando el programa Tagger del software Haploview 4.2 y la información derivada de población colombiana en el Proyecto 1000 Genomas. Se obtuvieron 17 tagSNPs que capturan 156 alelos con un promedio máximo de  $r^2$  equivalente a 0.944. Finalmente se analizaron 4 variantes informativas para capturar el mayor número de alelos posibles: rs9888879, rs889551, rs1143679 y rs7206295.

#### 7.4 Genotipificación de polimorfismos

La genotipificación se llevó a cabo mediante RT-PCR utilizando sondas TaqMan. Los ensayos de genotipificación de SNPs mediante sondas de fluorescencia TaqMan, consisten en una reacción 5' nucleasa de sondas de hibridación para detectar productos específicos de PCR que se acumulan durante los ciclos de la reacción. Cada sonda consta de un oligonucleótido marcado con un colorante reportero (FAM o VIC) unido al extremo 5' y un *quencher* (inhibidor del reportero) no fluorescente en el extremo 3' de la sonda. La presencia del *quencher* suprime la fluorescencia del reportero mientras no hay hibridación. Durante la PCR las sondas se anillan específicamente a una secuencia complementaria. La actividad 5' nucleasa de la Taq polimerasa produce el clivaje que libera el colorante reportero del *quencher*, resultando en un incremento de la fluorescencia en cada ciclo de PCR. Este incremento en la fluorescencia ocurre solo si la secuencia blanco es complementaria a la sonda y es amplificada durante la PCR. Para el sistema de discriminación alélica, un incremento en cualquiera de los colorantes fluorescentes FAM o VIC indica presencia de homocigotos para el alelo específico y un aumento en la fluorescencia de los dos colorantes indica heterocigotos (Figura 13).

Las reacciones de PCR se realizaron en el termociclador StepOnePlus. La amplificación se llevó a cabo en un volumen de 10 µL empleando 1µL de DNA, 2X de TaqMan Genotyping Master Mix y 1X de ensayo de genotipificación para cada polimorfismo. Las condiciones de PCR fueron: 1 ciclo de 95°C por 10 minutos para la activación de la enzima AmpliTaqGold y 40 ciclos de 95°C por 15 segundos (denaturación) y 60°C por un minuto (anillamiento y extensión).

La asignación del genotipo se realizó con el software incorporado en el sistema StepOnePlus de Applied Biosystem.



**Figura 13.** Ensayo de genotipificación de SNPs. Tomado de: Protocolo Applied Biosystem, 2010.

### 7.5 Análisis estadístico

Los test estadísticos se ejecutaron en el software PLINK v1.07. Se determinó el equilibrio de Hardy-Weinberg (HWE) en los casos y controles ( $p > 0.01$ ). Se aplicó un test de asociación alélica con un grado de libertad ( $X^2$ ) y un modelo de regresión logística. El nivel de significancia de cada SNPs fue corregido mediante el test de permutación. En el modelo de regresión logística se incluyó la edad y el género como covariables. Se aplicó un test de interacción con género y un test específico para evaluar el efecto de esta variable. Se consideró asociación alélica o genotípica del polimorfismo con susceptibilidad o protección al desarrollo de CCC, cuando se obtuvo un valor  $p < 0.01$  y un  $OR \neq 1$  con un intervalo de confianza del 95%. El poder estadístico fue calculado con el software STATA por comparación de proporciones de dos muestras independientes. Se usó un nivel de significancia (alfa) de 0,05. Se

analizó el efecto de la fracción de eyección mediante un t-test con el software STATA.

## **7.6 Consideraciones éticas**

De acuerdo al Artículo 11 de la Resolución 008430 de 1993 del Ministerio de Salud, las actividades que se ejecutaron en este trabajo, pertenecen a la categoría de investigación con riesgo mínimo.

Los pacientes incluidos en el estudio fueron aquellos quienes en el consentimiento informado de proyectos desarrollados 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 en investigaciones relacionadas con la genética de la EC.

La información obtenida en el estudio sólo se empleará con fines investigativos, no se mencionará el nombre de los sujetos participantes y la confidencialidad de los datos se mantendrá de acuerdo el Artículo 8 de la Resolución 008430 del Ministerio de Salud. Los datos fueron manejados con las medidas técnicas, humanas y administrativas necesarias para otorgar seguridad a los registros, para evitar su adulteración o acceso no autorizado como los 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.

Los residuos generados durante la investigación fueron dispuestos de acuerdo a lo estipulado en el Decreto 351 de 2014 de la Presidencia de la República de Colombia siguiendo los protocolos del Plan de Gestión Integral de Residuos (PGIR) de la UIS. Todos los procedimientos se llevaron a cabo aplicando las normas de bioseguridad establecidas en el manual de bioseguridad de la UIS, que forma parte del PGIR.

## 8. RESULTADOS

### 8.1 Análisis de la población

#### 8.1.1 Variables demográficas

La población de estudio corresponde a sujetos 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. El género masculino se asoció a la enfermedad con un riesgo de 1,6 mientras que el género femenino evidenció protección con la disminución de riesgo en 0,6 (Tabla 3).

#### 8.1.2 Variables clínicas

El 45% de los pacientes con serología positiva se encontró en fase I de la EC. La distribución de los pacientes con CCC correspondió a 21,6% fase II, 20,6% fase III y 12,8% fase IV (Tabla 3). El valor de la fracción de eyección mostró diferencias significativas entre los grupos de sujetos asintomáticos y sintomáticos ( $p=0,0003$ ). Un menor porcentaje de la fracción de eyección se asoció con la gravedad de la falla cardiaca (Tabla 3).

**Tabla 3.** Características demográficas y clínicas de la población en estudio

Variable	Casos	Controles	Valor $p$	OR IC 95%
<b>Masculino</b>	186 (27,1 %)	113 (16,5%)	0,002 <sup>a</sup>	1,6 [1,17-2,18]
<b>Femenino</b>	191 (27,8%)	186 (27,1%)	0,002 <sup>a</sup>	0,6 [0,45-0,84]
<b>Edad</b>	57	49	0,00001 <sup>b</sup>	
<b>Fracción de eyección</b>	48%	65%	0,0003 <sup>c</sup>	
<b>Fase I</b>	-	308 (45%)	NA	
<b>Fase II</b>	148 (21,6%)	-	NA	
<b>Fase III</b>	141 (20,6%)	-	NA	
<b>Fase IV</b>	88 (12,8%)	-	NA	

<sup>a</sup> Chi.cuadrado, <sup>b</sup> t-test <sup>c</sup> t-test aplicado para un  $n = 201$ . NA No aplica.

### 8.1.3 Equilibrio de Hardy-Weinberg

Las frecuencias alélicas y genotípicas de los pacientes asintomáticos y con cardiomiopatía se encontraron en equilibrio de Hardy-Weinberg (EHW) en todos los polimorfismos analizados ( $p > 0,01$ , Tabla 4).

**Tabla 4.** Valores  $p$  para el equilibrio de Hardy-Weinberg de las frecuencias alélicas de los polimorfismos estudiados.

Grupo	rs889551	rs1143679	rs9888879	rs7206295
<b>Sintomáticos</b>	0,73	0,91	0,81	0,83
<b>Asintomáticos</b>	0,61	0,19	0,07	0,72

### 8.2 Análisis de asociación alélica y genotípica

La distribución de las frecuencias alélicas del rs1143679 mostró que el alelo A se encuentra en mayor porcentaje en los pacientes con cardiomiopatía (24,5%) comparado con los sujetos asintomáticos (15,7%). Esta diferencia fue estadísticamente significativa y se mantuvo un valor  $p=0,0005$  después de realizar el análisis de regresión logística y aplicar test de corrección múltiple y permutaciones. El alelo A se asoció con riesgo (OR = 1,73) mientras que el alelo G se asoció con protección (OR = 0,57). El poder estimado para esta asociación fue de 81%. Las frecuencias genotípicas de este marcador evidenciaron diferencias significativas, el genotipo GG se observó en 72,1% en los controles y 55,6% de los casos, considerándose asociado con protección por disminución del riesgo a padecer CCC en 0,48. Por su parte, el genotipo heterocigoto fue más frecuente en sintomáticos (39,9%) que en asintomáticos (24,4%) y se asoció con riesgo. Para los demás marcadores analizados no se encontraron diferencias estadísticamente significativas (Tabla 5).

**Tabla 5. Análisis de frecuencias alélicas y genotípicas de los polimorfismos del gen *ITGAM* en pacientes asintomáticos y con cardiomiopatía chagásica**

		ASY		CCC		P	OR	IC
<b>rs889551</b>	AA	35	11,4%	48	12,8%	0,19	0,86	0,7 – 1,07
	AG	132	42,9%	168	44,7%	0,63	1,07	0,79 – 1,46
	GG	141	45,8%	160	42,6%	0,39	0,87	0,65 – 1,18
	A	202	32,8%	264	35,1%	0,36	1,11	0,88 – 1,38
	G	414	67,2%	488	64,9%	0,36	0,9	0,72 – 1,13
<b>rs1143679</b>	AA	11	3,6%	17	4,5%	0,53	1,3	0,58 – 2,8
	AG	75	24,4%	150	39,9%	0,00001*	2,06	1,48 – 2,88
	GG	222	72,1 %	209	55,6%	0,000008*	0,48	0,35 – 0,67
	A	97	15,7%	184	24,5%	0,00007*	1,73	1,32 – 2,28
	G	519	84,3%	568	75,5%	0,00007*	0,57	0,44 – 0,75
<b>rs9888879</b>	CC	9	2,9%	6	1,6%	0,23	0,53	0,17 – 1,54
	CT	64	20,1%	80	21,3%	0,89	1,03	0,71 – 1,4
	TT	234	76,2%	290	77,1%	0,78	1,05	0,73 – 1,5
	C	82	13,4%	92	12,2%	0,53	0,90	0,65 – 1,24
	T	532	86,6%	660	87,8%	0,53	1,11	0,80 – 1,52
<b>rs7206295</b>	CC	99	32,14%	105	28%	0,24	0,82	0,59 – 1,14
	CT	148	48,1%	185	49,3%	0,74	1,05	0,77 – 1,42
	TT	61	19,8%	85	22,6%	0,36	1,19	0,82 – 1,72
	C	346	56,2%	395	52,6%	0,19	0,86	0,70 – 1,07
	T	270	43,8%	355	47,3%	0,19	1,15	0,92 – 1,42

\*Valor *p* corregido=0,0005

### 8.2.1 Análisis de asociación alélica estratificado por género

El test de interacción con género detectó diferencias significativas para el rs889551 ( $p=0,0083$  Tabla 6). No se observaron diferencias estadísticamente significativas para los demás marcadores analizados.

**Tabla 6. Análisis de interacción de los marcadores con género**

Polimorfismo	Test	Valor p
rs889551	ADDxSEX	0,008
rs1143679	ADDxSEX	0,728
rs9888879	ADDxSEX	0,985
rs7206295	ADDxSEX	0,291

En el test de asociación específica de género el alelo A del rs889551 se encontró en mayor porcentaje en los hombres con cardiomiopatía y se asoció a riesgo ( $p=0,006$  OR 1,64 IC95% 1,15 – 2,37; Poder = 57%) (Tabla 7). De igual forma el genotipo AA mostró diferencias significativas ( $p=0,04$  OR 2,15 IC95% 1,03-4,76). Por el contrario, el alelo G se asoció a protección ( $p=0,006$  OR 0,6 IC95% 0,42 – 0,87). El genotipo GG se observó en mayor porcentaje en los hombres asintomáticos (54,8%), comparado con los sintomáticos (41,6%). Esta diferencia fue estadísticamente significativa ( $p=0,02$  OR 0,58 IC95% 0,36 – 0,94) (Poder = 66%). La asociación encontrada para el rs1143679 se mantuvo estadísticamente significativa después de realizar la diferenciación por género. Para este marcador el valor  $p$  de interacción no fue significativo ( $p=0,72$ ).

**Tabla 7. Análisis de frecuencias alélicas en hombres y mujeres**

Marcador	Alelo	Mujeres	Mujeres	<i>P</i>	Hombres	Hombres	<i>p</i>
		ASY n = 195	CCC n = 191		ASY n = 113	CCC n = 185	
<b>rs889551</b>	A	36,2%	32,4%	0,28	26,9%	37,8%	0,006
	G	63,8%	67,5%		73%	62,2%	
<b>rs1143679</b>	A	15,6%	23,8%	0,004	15,9%	25,1%	0,008
	G	84,4%	76,2%		84%	74,8%	
<b>rs9888879</b>	C	13,1%	12,1%	0,64	13,4%	12,4%	0,73
	T	86,9%	87,9%		86,6%	87,5%	
<b>rs7206295</b>	C	54,6%	53,4%	0,74	58,8%	51,8%	0,09
	T	45,4%	46,6%		41,2%	48,2%	

### 8.2.2 Análisis de asociación alélica y genotípica con severidad

Se determinó la frecuencia alélica y genotípica en el grupo de sintomáticos en diferente fase de falla cardiaca. Se calculó el valor *p* y el OR con un IC del 95%. Los resultados no mostraron diferencias estadísticamente significativas (Tabla 8).

**Tabla 8. Análisis de frecuencias alélicas y genotípicas de los polimorfismos del gen *ITGAM* en pacientes con cardiomiopatía chagásica leve y severa**

Marcador	CCC II		CCC III-IV		<i>p</i>	OR	IC	
<b>rs889551</b>	AA	20	13,5%	28	12,3%	0,72	0,89	0,48 – 1,67
	AG	69	46,6%	99	43,4%	0,54	0,87	0,57 – 1,33
	GG	59	39,8%	101	44,3%	0,39	1,2	0,78 – 1,83
	A	109	36,8%	155	33,9%	0,42	0,88	0,65 – 1,2
	G	187	63,2%	301	66%	0,42	1,13	0,83 – 1,5
<b>rs1143679</b>	AA	4	2,7%	13	5,7%	0,17*	2,17	0,72 – 7,8
	AG	66	44,6%	84	36,8%	0,13	0,72	0,47 – 1,1
	GG	78	52,7%	131	57,5%	0,36	1,2	0,79 – 1,83
	A	74	25%	110	24,1%	0,78	0,95	0,67 – 1,34
	G	222	75%	346	75,8%	0,78	1,05	0,74 – 1,47
<b>rs9888879</b>	CC	2	1,4%	4	1,8%	0,76*	1,3	0,22 – 10,2
	CT	35	23,6%	45	19,7%	0,36	0,79	0,48 – 1,31
	TT	111	75%	179	78,5%	0,42	1,22	0,74 – 1,98
	C	39	13,1%	53	11,6%	0,52	0,87	0,55 -1,35
	T	257	86,8%	403	88,4%	0,52	1,15	0,73 – 1,79
<b>rs7206295</b>	CC	39	26,5%	66	28,9%	0,61	1,13	0,71 – 1,8
	CT	73	49,7%	112	49,1%	0,91	0,98	0,64 – 1,48
	TT	35	23,8%	50	21,9%	0,67	0,89	0,54 – 1,48
	C	151	51,4%	244	53,5%	0,56	1,09	0,81 – 1,46
	T	143	48,6%	212	46,5%	0,56	0,92	0,68 – 1,23

\*Prueba de Fisher

## 9. DISCUSIÓN

En el presente trabajo se seleccionó como gen candidato *ITGAM* por presentar expresión diferencial entre individuos con CCC y asintomáticos y por su participación en vías de señalización que regulan la respuesta inmune y que podrían favorecer la inflamación crónica característica de la EC.

El marcador rs1143679 (G/A) es un polimorfismo no sinónimo que conduce a un cambio del aminoácido arginina a histidina en la posición 77 (R77H) del dominio  $\beta$ -hélice de Mac-1. La MAF global es de 0,09 y en nuestro estudio fue 0,2 evidenciando una mayor frecuencia en nuestra población. El alelo A se asoció con el desarrollo de CCC y el alelo G con protección. R77H produce una deficiencia en la afinidad por ligandos y en la maduración del estado de afinidad, lo que retarda la separación de la cola citoplasmática y la extensión completa de la integrina (Rossetti *et al.*, 2015). Este defecto podría afectar potencialmente las funciones mediadas por la integrina e impactar en el desarrollo de la EC. Se considera que R77H produce alteraciones en la proteína que contribuyen a la amplificación y perpetuación de la respuesta efectora y autoinmunidad crónica (Rosetti, 2016). De esta manera, la asociación encontrada con CCC podría ser consecuencia de cuatro efectos fundamentales: inhibición de cascadas de señalización involucradas en regulación negativa, defectos en la fagocitosis, aumento en la expresión y/o activación continua de vías que favorecen la inflamación. La figura 14 presenta la hipótesis de estos efectos sobre el desarrollo de la CCC.

Con respecto a los dos primeros efectos postulados, la presencia de R77H produce defectos en la afinidad por ligando y en los cambios conformacionales que conducen a la activación de la integrina, lo que se traduce en una disminución de las funciones de regulación negativa mediadas por Mac-1 y en una menor eficiencia de la fagocitosis. En cuanto a la inhibición de cascadas de señalización involucradas en regulación negativa, es posible que R77H impida la señalización reguladora mediada por Mac-1 a través de cambios en la afinidad y fuerzas de disociación ligando-integrina (Rosetti *et al.*, 2015). Se ha demostrado que la activación de Mac-

1 tiene como efecto la inhibición de secreción de citoquinas proinflamatorias dependientes de TLR, lo cual podría explicar el efecto protector del genotipo GG (R77) en enfermedades autoinmunes (Reed *et al* 2012). En este sentido, la activación de TLR-2 inducida por la unión a GPI en la membrana de *T. cruzi* y/o TLR-9 que reconoce DNA del parásito conduce a la producción de TNF e IL-6. En condiciones normales, los TLR llevan a la activación de Mac-1 en sentido de adentro hacia afuera para suprimir la producción de citoquinas pro-inflamatorias como un mecanismo de retroalimentación negativa (Han *et al.*, 2010. Means & Luster, 2010). Sin embargo, en presencia de la variante esta regulación negativa estaría afectada, lo cual aumentaría la respuesta mediada por TLR. Dicha respuesta aunque puede ser benéfica en el control de la infección por *T. cruzi*, podría ser perjudicial en la fase crónica generando un desequilibrio en la regulación del proceso inflamatorio. La deficiencia de Mac-1 conduce a un aumento en la producción de IL-6 que promueve la diferenciación de células Th17 (Ehrichtiou *et al.*, 2007). Este subtipo de células T favorece la inflamación y el daño tisular, produce IL-17 la cual sobre-regula Mac-1 favoreciendo la interacción con mieloperoxidasa (MPO). Esta interacción activa vías anti-apoptóticas incrementando la vida media del neutrófilo en la circulación durante las condiciones inflamatorias crónicas (Milanova *et al.*, 2014). Teniendo en cuenta que los pacientes seropositivos a antígenos de *T. cruzi* muestran una actividad incrementada de MPO, es posible que por esta vía se incremente la vida media de las células que expresan Mac-1, lo que facilitaría el mantenimiento de la inflamación, en los pacientes con CCC. Por otra parte, el estudio de macrófagos aislados de sujetos homocigotos para el alelo G (R77) demostró que la activación de Mac-1 disminuye significativamente la producción de TNF $\alpha$  e IL1 $\beta$ . Por el contrario, esta inhibición estuvo reducida en macrófagos homocigotos para el alelo A (77H) (Rhodes *et al.*, 2012). Puesto que los sujetos con CCC evidencian altos niveles de TNF $\alpha$  asociados con el grado de severidad de la enfermedad, es posible que en los pacientes con cambio de aminoácido se dé mayor producción de TNF $\alpha$  por menor capacidad de inhibición por parte de Mac-1. De igual forma la incapacidad de inhibir la producción de IL1 $\beta$  favorecería la fibrosis e hipertrofia del miocito, así como la

liberación de radicales libres de oxígeno que afectarían el equilibrio electrofisiológico del miocardio, conllevando a falla cardíaca. También se ha descrito que la activación de Mac-1 inhibe la producción de IL-12 y suprime la diferenciación hacia células Th1 (Varga *et al.*, 2007). Esta actividad se ha demostrado por la unión de la integrina con *Leishmania* y algunos anticuerpos (Ricardo-Carter, 2013). Los defectos en la afinidad de unión a ligandos ocasionados por R77H podrían producir un desequilibrio que favorecería la diferenciación a células Th1. Este tipo de células produce fundamentalmente INF $\gamma$ . En ausencia de regulación negativa, la secreción de INF $\gamma$  incrementaría el potencial citotóxico de los linfocitos T CD8+, células que participan en la generación de lesiones en el tejido cardíaco y en el desarrollo de CCC.

En segundo lugar es posible que Mac-1 esté relacionado con el reconocimiento y fagocitosis de *T. cruzi*. En este caso, R77H afectaría estos procesos probablemente a través de la polarización de Mac-1 en la membrana. Un desequilibrio en estas funciones produciría defectos en la eliminación del parásito favoreciendo su persistencia y por ende el proceso inflamatorio. Se ha sugerido que Mac-1 puede actuar en la infección de células por tripanosomátidos mediando la adhesión celular de promastigotes opsonizados por el complemento (Souza *et al* 2004). Este fenómeno se ha corroborado en *Leishmania major* demostrando que Mac-1 reconoce lipofosfoglicano del parásito (Ricardo-Carter *et al.*, 2013). En contraste con lo anterior, mediante inmunocitoquímica con anti-CD11b se encontró que en las células con genotipo GG Mac-1 se distribuye de forma homogénea en la superficie celular unido a ICAM-1, mientras que en las células AA está polarizado en la membrana. Esta polarización puede obstaculizar eventos de reconocimiento involucrados en fagocitosis afectando la activación del complemento y la señalización de TLR9 (Maiti *et al* 2014). En ese mismo orden de ideas, Zhou *et al* determinaron el efecto de R77H sobre las funciones biológicas de Mac-1 y observaron que la capacidad fagocítica de los neutrófilos estuvo significativamente disminuida en los individuos con este cambio de aminoácido. Se concluyó que R77H

puede afectar la afinidad por su ligando lo que resulta en deficiencia de la fagocitosis (Zhou *et al.*, 2013).

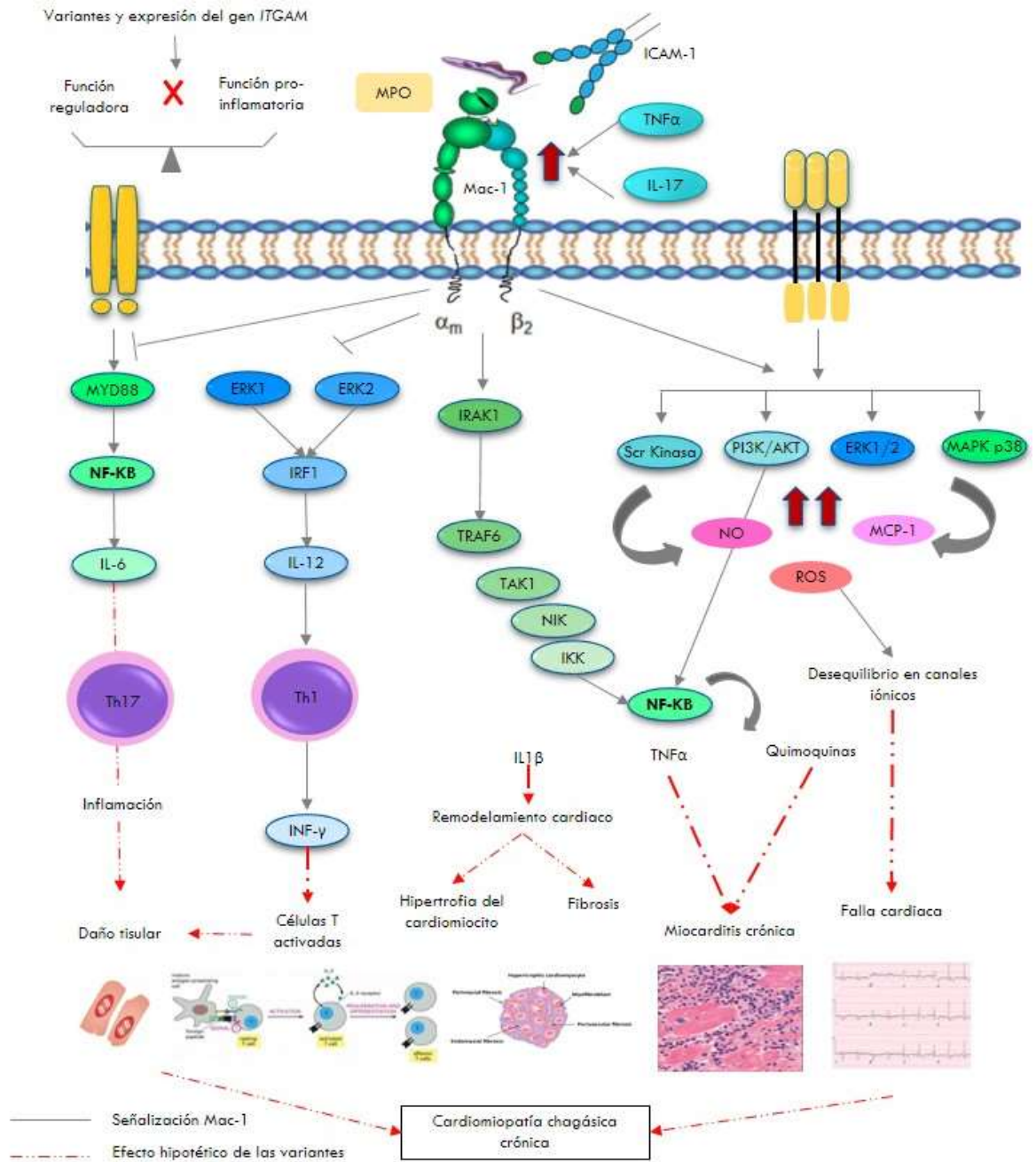
En relación con el aumento de la expresión, el gen *ITGAM* en estudios previos del grupo, mostró sobre-expresión en células mononucleares de sangre periférica de pacientes con CCC retadas con tripomastigotes de *T. cruzi*. En este grupo de pacientes R77H tuvo una mayor frecuencia que en el grupo de individuos asintomáticos, por lo cual estaría involucrado en la patogénesis de la CCC. Además es posible que R77H aunque se encuentra en región exónica influya en la expresión del gen. Como soporte de esta afirmación encontramos que los datos del proyecto ENCODE mostraron una mayor densidad del marcador de histona activa en la secuencia que contiene el R77H, incluso mayor que la de la región promotora del gen. Así mismo, el polimorfismo se encuentra en una región activa de la cromatina sugerida por sitios de hipersensibilidad a DNAsa I. Experimentos de CHIP-Seq detectaron la unión de diferentes factores de transcripción relacionados con respuesta inmune, incluidos EBF1, que controla el desarrollo de linfocitos, PAX5, NFKB1, JunD, TCF12, BCL11a, BATF y SP1 (Maiti *et al.*, 2014). Probablemente el alelo A esté implicado en el aumento de la expresión de Mac-1, favoreciendo procesos como activación de macrófagos a través de la producción de IFN $\gamma$  por Th1 y diferenciación de linfocitos, funciones claves en el desarrollo de la CCC. Sin embargo, existe controversia en relación con la asociación entre los niveles de expresión y la variante debido a que diferentes estudios en subtipos de monocitos y células NK no han logrado establecerla (Rhodes *et al* 2012, Zhou, *et al* 2013, Roberts *et al* 2016). Este es el caso de un estudio en pacientes con LES, en el cual, contrario a nuestras observaciones, los niveles de expresión de Mac-1 fueron más bajos en células con genotipo AA y mayores en el genotipo GG (R77). La menor expresión de RNA fue específica para el alelo de riesgo A y no debida a una maduración aberrante o degradación, sino a la pérdida de actividad potenciadora, particularmente en monocitos, puesto que el alelo A transcribe un 20% menos que el alelo protector (Maiti *et al.*, 2014). De esta manera, para aseverar si en nuestra

población existe una relación del aumento en la expresión protéica con el alelo A, ésta debería comprobarse estudiando los fenotipos celulares presentes en los grupos de pacientes sintomáticos y asintomáticos de la EC. También es posible que el polimorfismo se encuentre en LD con otro que lleve a cambios en la expresión. Los cambios en la expresión observados por el grupo en estudio previo podrían deberse no sólo a la presencia de polimorfismos funcionales sino también a la producción de TNF $\alpha$ , citoquina liberada en altos niveles en los pacientes con la forma cardíaca de la EC (Mendes da Silva, 2016). Esta afirmación se sustenta en investigaciones que han demostrado que TNF $\alpha$  sobre-regula la expresión de Mac-1 en neutrófilos (Montecucco, 2008). El aumento en la expresión podría correlacionarse con la presencia de macrófagos CD11b<sup>+</sup>. Este tipo de células se han reportado en el infiltrado inflamatorio del corazón de ratones con Chagas crónico. En este modelo se ha sugerido que los macrófagos CD11b<sup>+</sup> se encuentran en contacto con miofibrillas y pueden directamente contribuir al daño cardíaco a través de la secreción de TNF $\alpha$ . Además los macrófagos están en contacto con linfocitos T en el foco inflamatorio, presentando antígenos por moléculas MHC Clase II a linfocitos T CD4<sup>+</sup> los cuales secretan INF $\gamma$  incrementado el potencial citotóxico de macrófagos y linfocitos T CD8<sup>+</sup> (Soares *et al.*, 2010). Estos resultados concuerdan con diferentes estudios que han establecido el papel perjudicial de la integrina en la producción de alteraciones cardíacas. Por ejemplo, en modelo murino de cardiomiopatía dilatada se demostró infiltrado de células CD11b<sup>+</sup> relacionado con fibrosis y atrofia de miocitos (Maier *et al.*, 2012). En pacientes con isquemia y enfermedad cardíaca, el incremento en células CD11b<sup>+</sup> se asoció con la disminución en la fracción de eyección (Cogle *et al.*, 2014). Así mismo, ratones con *knockout* CD11b<sup>-/-</sup> mostraron protección a la inducción de fibrosis atrial y conservación de la conductancia eléctrica. Por el contrario, en los ratones CD11b<sup>+</sup> se demostró que Mac-1 promueve el inicio y la propagación de la fibrosis en el tejido cardíaco (Friedrichs *et al.*, 2014).

El aumento en la expresión de Mac-1 favorecido por R77H o por una variante en LD con esta, podría dar lugar al último efecto sugerido que es la activación continua de vías que favorecen la inflamación. Mac-1 puede mediar tanto señales relacionadas con inhibición como con activación de respuesta inmune. Como se indicó previamente la activación de adentro hacia afuera de Mac-1 conduce a la regulación negativa de la señalización por TLR (Han *et al.*, 2010. Means & Luster, 2010). Sin embargo, la activación de afuera hacia adentro mediada por la unión ligando-integrina, puede inducir señales relacionadas con activación. En este sentido, la unión de Mac-1 con sus ligandos resulta en un programa de respuesta pro-inflamatoria, incluyendo adhesión de leucocitos, migración, reclutamiento y promoción de la liberación de anión superóxido (Rosetti *et al.*, 2016). Por ejemplo, la activación de Mac-1 por el uso de anticuerpos monoclonales anti-CD11b o mediadores solubles que pueden generar señalización celular, inducen liberación de citoquinas proinflamatorias (IL-1B o TNF $\alpha$ ) (Rezzonico *et al.*, 2000). En este orden de ideas *ITGAM* hace parte de una red biológica que se conecta con diferentes genes de importancia en la patogénesis de la EC, como *IL12*, *IL4*, *TGFB1*, *INFG* e *IL1B*. Algunos polimorfismos presentes en estos genes se han encontrado asociados a CCC en población colombiana y se correlacionan con una mayor producción de citoquinas de perfil pro-inflamatorio (IL12, IL1 $\beta$ ) (Seegers *et al.*, 2002. Hall *et al.*, 2004). IL12 induce una respuesta de tipo Th1 con producción de INF $\gamma$  que en caso de ser prolongada e intensa, podría favorecer la progresión de la enfermedad cardíaca (Gomes *et al.*, 2003). Se ha demostrado que Mac-1 inhibe la producción de IL12, sin embargo, como se describió con anterioridad defectos en esta función inducidos por cambios en la estructura de la proteína, estarían relacionados con un aumento en la inducción de la diferenciación y activación de linfocitos Th1 (Ricardo-Carter *et al.*, 2013 & Varga *et al.*, 2007). IL1B participa en la inhibición del crecimiento de *T. cruzi* mediante la producción de óxido nítrico (NO), sin embargo su incremento podría ser desfavorable durante la fase crónica de la EC cuando la cantidad de parásito es muy baja, debido a que el aumento en la producción de NO promueve la miocarditis (Roman-Campos *et al.*, 2013). De igual

forma esta interleuquina puede inducir remodelamiento cardíaco causando fibrosis e hipertrofia del miocito. Diferentes vías de señalización mediadas por Mac-1 promueven la liberación de IL-1B por activación de NFkB. De esta manera es posible que la expresión de *ITGAM* favorezca el desarrollo de fibrosis en el tejido cardíaco de los pacientes con CCC. TGFB1 ha sido asociado con incremento en la supervivencia del parásito y con la severidad de la infección (Araujo *et al.*, 2002). Probablemente el aumento en la expresión de *ITGAM* favorezca la producción de estas citoquinas aportando a la susceptibilidad al desarrollo de la CCC.

En resumen, en el contexto de la EC el cambio del aminoácido R77H estaría implicado en la reducción de las funciones de regulación negativa, mientras que las funciones pro-inflamatorias se mantendrían activas por la expresión de la proteína y por la interacción con diferentes vías celulares como se postuló previamente en la hipótesis presentada. Esta afirmación concuerda con estudios realizados en LES que vinculan la asociación de este polimorfismo con defectos en las funciones inhibitorias de la proteína, mientras que las funciones pro-inflamatorias de la integrina no se ven afectadas (Rosetti *et al.*, 2015-2016). Las células con la variante no pierden la capacidad de inducir señales activadoras pero sí tienen una capacidad disminuida para regular la liberación de citoquinas pro-inflamatorias (Rhodes *et al.*, 2012).



**Figura 14.** Vías de señalización potencialmente afectadas por los polimorfismos del gen *ITGAM* asociados con el desarrollo de CCC.

El marcador rs889551 corresponde a un cambio de G por A y es una variante ubicada en región reguladora. Nuestros resultados mostraron frecuencias del alelo menor (A) muy similares para el grupo de sintomáticos y asintomáticos sin diferencias significativas. Sin embargo, el análisis de interacción mostró una asociación estadísticamente significativa para este marcador y el género masculino ( $p=0,008$ ). Los hombres con alelo A y genotipo AA evidenciaron un mayor riesgo al desarrollo de CCC (OR=1,64 y 2,15 respectivamente), lo que implica que el efecto sobre la predisposición al desarrollo de la enfermedad es dosis-dependiente. De igual forma, al realizar el análisis por fases (datos no mostrados), se encontró una diferencia significativa en las frecuencias alélicas de los sujetos fase III comparado con los pacientes en fase IV ( $p=0,04$  OR 1,5 IC 95% 1,01 – 2,25). El alelo A se asoció con un fenotipo de mayor severidad mientras que el alelo G se asoció con protección por presentar mayor frecuencia en los sujetos en fase III ( $p=0,04$  OR 0,66 IC 95% 0,44-0,98). Debido a que el marcador rs889551 se encuentra en una región reguladora, es posible que la presencia del alelo A inflencie la expresión del gen. Este efecto podría explicar en parte la asociación encontrada con los individuos en fase IV, puesto que como se describió previamente el aumento en la expresión está relacionado con la presencia de alteraciones cardíacas. Asimismo en el género masculino la inducción de una mayor expresión podría conllevar al mantenimiento de la respuesta inflamatoria.

La variante rs9888879 es un cambio de C por T y se sitúa en una región intrónica. En el presente estudio no se encontraron diferencias significativas en las frecuencias alélicas y genotípicas de casos y controles. Sin embargo, el alelo C podría tener un efecto discreto en protección al desarrollo de un fenotipo con mayor severidad dado que se presentó en menor frecuencia en los pacientes de fase IV (7,9%) frente a pacientes en fase II (13,1%) y fase III (13,9%). Sin embargo estas diferencias no fueron significativas probablemente por el pequeño tamaño de muestra en cada una de las fases. Efectos similares en severidad fueron observados en un estudio realizado en sujetos con LES en población europea e

hispanoamericana, en los cuales el alelo C se asoció con diferentes manifestaciones clínicas de LES. A pesar de encontrar asociación de este y otros marcadores con LES, los autores afirman que dicha asociación puede ser un reflejo del fuerte desequilibrio de ligamiento con el rs1143679 (Jarvinen *et al.*, 2010). Esta hipótesis se fundamenta en que todos los haplotipos que llevan el alelo A de este polimorfismo confieren riesgo para LES en la población estudiada.

El rs7206295 corresponde a un cambio de C por T y es una variante localizada en un intrón. Nuestros análisis no mostraron asociación significativa con desarrollo o severidad de la EC. Este polimorfismo fue estudiado en LES sin encontrarse diferencias significativas en población europea, hispanoamericana y japonesa. Sólo en población de Corea se encontró un asociación significativa leve ( $p=0,042$  OR 0,82 IC 95% 0,69 -0,99). En población hispanoamericana la MAF de los casos con LES fue de 0,4 y la de los controles 0,39 (Han *et al.*, 2009). En nuestra población la MAF de los pacientes sintomáticos fue 0,43 y de los asintomáticos 0,47. Estos valores son muy similares a las frecuencias reportadas por el proyecto 1000 genomas para población americana y colombiana (0,44 y 0,45 respectivamente).

La principal limitación de este estudio fue el tamaño de muestra, específicamente controles del género masculino, lo cual se reflejó en la potencia estadística para la asociación del rs889551 (poder  $\sim 60$ ). De igual forma en el análisis de severidad el bajo número en cada uno de los subgrupos de pacientes sintomáticos probablemente dificultó el hallazgo de asociaciones.

## 10. CONCLUSIONES

El alelo A del polimorfismo rs1143679 se encontró con mayor frecuencia en los pacientes con CCC con diferencias estadísticamente significativas, por lo tanto podría ser considerado un factor de riesgo para el desarrollo de cardiomiopatía en la población analizada.

El alelo A del rs889551 se encontró con mayor frecuencia en los hombres con CCC con diferencias estadísticamente significativas, lo cual sugiere que podría estar asociado al desarrollo de CCC en el género masculino.

El alelo A del rs889551 presentó mayor frecuencia en los individuos con CCC fase IV comparado con los individuos en fase III, esta diferencia fue estadísticamente significativa por lo que sugiere asociación con mayor severidad.

Las frecuencias alélicas y genotípicas de los rs9888879 y rs7206295 en los grupos de sintomáticos y asintomáticos no mostraron diferencias estadísticamente significativas, sugiriendo que no se asocian al desarrollo ni severidad de la EC.

## 11. RECOMENDACIONES

Aumentar el número de individuos de género masculino en fase asintomática de la enfermedad para mejorar el poder de la asociación encontrada con el rs889551.

Estudiar un mayor número de polimorfismos incluyendo variantes en desequilibrio de ligamiento para determinar asociación de haplotipos.

Realizar estudios funcionales de la variante rs1143679 para definir si el alelo A afecta la expresión y la función de la proteína Mac-1 en los individuos con EC.

Desarrollar estudios experimentales que corroboren la participación de Mac-1 en el reconocimiento y fagocitosis de *T. cruzi*.

Llevar a cabo análisis de interacción con las variantes en los genes que participan en la red de *ITGAM* en las que se ha demostrado su papel en la patogénesis de la EC.

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

Desarrollar estudios de seguimiento para definir el valor pronóstico del polimorfismo rs1143679 en los sujetos asintomáticos.

## BIBLIOGRAFÍA

ABRAM, Clare L.; LOWELL, Clifford A. The ins and outs of leukocyte integrin signaling. *Annual Review of Immunology*, 2009, vol. 27, p. 339.

ANAYA, Juan-Manuel, et al. Evaluation of genetic association between an ITGAM non-synonymous SNP (rs1143679) and multiple autoimmune diseases. *Autoimmunity Reviews*, 2012, vol. 11, no 4, p. 276-280.

ARNEZ, Lucia Elena Alvarado, et al. Sequence variation in the IL4 gene and resistance to *Trypanosoma cruzi* infection in Bolivians. *The Journal of Allergy and Clinical Immunology*, 2011, vol. 127, no 1, p. 279.

AUFDERHEIDE, Arthur C., et al. A 9,000-year record of Chagas' disease. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 2004, vol. 101, no 7, p. 2034-2039.

AYO, Christiane Maria, et al. Association of the functional MICA-129 polymorphism with the severity of chronic Chagas heart disease. *Clinical Infectious Diseases*, 2015, vol. 61, no 8, p. 1310-1313.

AYO, Christiane Maria, et al. Genetic susceptibility to Chagas disease: an overview about the infection and about the association between disease and the immune response genes. *BioMed Research International*, 2013, vol. 2013.

BAI, Yi, et al. Integrin CD11b negatively regulates TLR9-triggered dendritic cell cross-priming by upregulating microRNA-146a. *The Journal of Immunology*, 2012, vol. 188, no 11, p. 5293-5302.

BERAUN, Y., et al. Polymorphisms at tumor necrosis factor (TNF) loci are not associated with Chagas' disease. *Tissue Antigens*, 1998, vol. 52, no 1, p. 81-83.

BERN, Caryn, et al. Trypanosoma cruzi and Chagas' disease in the United States. *Clinical Microbiology Reviews*, 2011, vol. 24, no 4, p. 655-681.

BERN, Caryn. Chagas' disease. *New England Journal of Medicine*, 2015, vol. 373, no 5, p. 456-466.

BOLDT, Angelica BW; LUZ, Paola R.; MESSIAS-REASON, Lara JT. MASP2 haplotypes are associated with high risk of cardiomyopathy in chronic Chagas disease. *Clinical Immunology*, 2011, vol. 140, no 1, p. 63-70.

BORRÁS, Silvia García, et al. HLA class II DRB1 polymorphism in Argentinians undergoing chronic Trypanosoma cruzi infection. *Annals of Clinical Biochemistry*, 2006, vol. 43, no 3, p. 214-216.

CALZADA, J. E., et al. No evidence for association of the inducible nitric oxide synthase promoter polymorphism with Trypanosoma cruzi infection. *Tissue Antigens*, 2002, vol. 59, no 4, p. 316-319.

CALZADA, J. E., et al. Lack of association between NRAMP1 gene polymorphisms and Trypanosoma cruzi infection. *Tissue Antigens*, 2001, vol. 57, no 4, p. 353-357.

CALZADA, J. E., et al. Chemokine receptor CCR5 polymorphisms and Chagas' disease cardiomyopathy. *Tissue Antigens*, 2001, vol. 58, no 3, p. 154-158.

CALZADA, Jose E., et al. Transforming growth factor beta 1 (TGFβ1) gene polymorphisms and Chagas disease susceptibility in Peruvian and Colombian patients. *Cytokine*, 2009, vol. 45, no 3, p. 149-153.

CAMBI, Alessandra; VAN HELDEN, Suzanne FG; FIGDOR, Carl G. Roles for Integrins and Associated Proteins in the Haematopoietic System. 2000.

CAMPOS, Marco AS, et al. Activation of Toll-like receptor-2 by glycosylphosphatidylinositol anchors from a protozoan parasite. *The Journal of Immunology*, 2001, vol. 167, no 1, p. 416-423.

CAMPOS, Marco A.; GAZZINELLI, Ricardo T. Trypanosoma cruzi and its components as exogenous mediators of inflammation recognized through Toll-like receptors. *Mediators of Inflammation*, 2004, vol. 13, no 3, p. 139-143.

CESTARI, Igor; RAMIREZ, Marcel I. Inefficient complement system clearance of Trypanosoma cruzi metacyclic trypomastigotes enables resistant strains to invade eukaryotic cells. *Plos One*, 2010, vol. 5, no 3, p. e9721.

COGLE, Christopher R., et al. Detailed analysis of bone marrow from patients with ischemic heart disease and left ventricular dysfunction BM CD34, CD11b, and clonogenic capacity as biomarkers for clinical outcomes. *Circulation Research*, 2014, vol. 115, no 10, p. 867-874.

COSTA, Germano C., et al. Functional IL-10 gene polymorphism is associated with Chagas disease cardiomyopathy. *Journal of Infectious Diseases*, 2009, vol. 199, no 3, p. 451-454.

COSTALES, Jaime A.; DAILY, Johanna P.; BURLEIGH, Barbara A. Cytokine-dependent and-independent gene expression changes and cell cycle block revealed in Trypanosoma cruzi-infected host cells by comparative mRNA profiling. *BMC Genomics*, 2009, vol. 10, no 1, p. 1.

COURA, José Rodrigues. Chagas disease: what is known and what is needed-A background article. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, 2007, vol. 102, p. 113-122.

CRIADO, Libeth, et al. Genetic polymorphisms in TNFA/TNFR2 genes and Chagas disease in a Colombian endemic population. *Cytokine*, 2012, vol. 57, no 3, p. 398-401.

CRUZ, Gabriela da Silva, et al. Assessment of Galectin-3 Polymorphism in Subjects with Chronic Chagas Disease. *Arquivos Brasileiros de Cardiologia*, 2015, vol. 105, no 5, p. 472-478.

CRUZ-ROBLES, David, et al. MHC class I and class II genes in Mexican patients with Chagas disease. *Human Immunology*, 2004, vol. 65, no 1, p. 60-65.

CRUZ-ROBLES, David, et al. Association between IL-1B and IL-1RN gene polymorphisms and Chagas' disease development susceptibility. *Immunological Investigations*, 2009, vol. 38, no 3-4, p. 231-239.

CUNHA-NETO, Edecio; CHEVILLARD, Christophe. Chagas disease cardiomyopathy: immunopathology and genetics. *Mediators of Inflammation*, 2014, vol. 2014.

DALÁLIO, MM De Oliveira, et al. Association of HLA-DR2 with chronic chagasic cardiopathy in a population at Paraná Northeast region, Brazil. *Acta Scientiarum*, 2002, vol. 24, p. 727-730.

DE ARAUJO, Fernanda Fortes, et al. Regulatory T cells phenotype in different clinical forms of Chagas' disease. *Plos Negl Trop Dis*, 2011, vol. 5, no 5, p. e992.

DEGHAIDE, N. H. S.; DANTAS, R. O.; DONADI, E. A. HLA class I and II profiles of patients presenting with Chagas' disease. *Digestive Diseases and Sciences*, 1998, vol. 43, no 2, p. 246-252.

DEL PUERTO, Florencia, et al. Protective human leucocyte antigen haplotype, HLA-DRB1\* 01-B\* 14, against chronic Chagas disease in Bolivia. *Plos Negl Trop Dis*, 2012, vol. 6, no 3, p. e1587.

DE MELO, Adriene Siqueira, et al. IL-10 and IFN- $\gamma$  gene expression in chronic Chagas disease patients after in vitro stimulation with recombinant antigens of *Trypanosoma cruzi*. *Cytokine*, 2012, vol. 58, no 2, p. 207-212.

DE OLIVEIRA, Amanda Priscila, et al. Genetic Susceptibility to Cardiac and Digestive Clinical Forms of Chronic Chagas Disease: Involvement of the CCR5 59029 A/G Polymorphism. *Plos One*, 2015, vol. 10, no 11, p. e0141847.

DIAS, Fabrício C., et al. Polymorphic sites at the immunoregulatory CTLA-4 gene are associated with chronic chagas disease and its clinical manifestations. *Plos One*, 2013, vol. 8, no 10, p. e78367.

DIAS, João Carlos Pinto, et al. Mecanismos alternativos de transmissão do *Trypanosoma cruzi* no Brasil e sugestões para sua prevenção. *Rev Soc Bras Med Trop*, 2011, vol. 44, no 3, p. 375-379.

DÍAZ, Martha L.; GONZÁLEZ, Clara I. Enfermedad de Chagas agudo: transmisión oral de *Trypanosoma cruzi* como una vía de transmisión re-emergente. *Revista de la Universidad Industrial de Santander. Salud*, 2014, vol. 46, no 2, p. 177-188.

DOS SANTOS GOLDENBERG, Regina Coeli, et al. Transcriptomic alterations in Trypanosoma cruzi-infected cardiac myocytes. *Microbes and Infection*, 2009, vol. 11, no 14, p. 1140-1149.

DRIGO, Sandra A., et al. Lack of association of tumor necrosis factor- $\alpha$  polymorphisms with Chagas disease in Brazilian patients. *Immunology Letters*, 2007, vol. 108, no 1, p. 109-111.

DUTRA, Walderez O., et al. Immunoregulatory networks in human Chagas disease. *Parasite Immunology*, 2014, vol. 36, no 8, p. 377-387.

DUTRA, Walderez O., et al. Activated T and B lymphocytes in peripheral blood of patients with Chagas' disease. *International Immunology*, 1994, vol. 6, no 4, p. 499-506.

EHIRCHIOU, Driss, et al. CD11b facilitates the development of peripheral tolerance by suppressing Th17 differentiation. *The Journal of Experimental Medicine*, 2007, vol. 204, no 7, p. 1519-1524.

FAÉ, Kellen C., et al. HLA and  $\beta$ -myosin heavy chain do not influence susceptibility to Chagas' disease cardiomyopathy. *Microbes and Infection*, 2000, vol. 2, no 7, p. 745-751.

FAN, Sao-tah; EDGINGTON, Thomas S. Integrin regulation of leukocyte inflammatory functions. CD11b/CD18 enhancement of the tumor necrosis factor-alpha responses of monocytes. *The Journal of Immunology*, 1993, vol. 150, no 7, p. 2972-2980.

FERNANDEZ-MESTRE, M. T.; MONTAGNANI, S.; LAYRISSE, Z. Is the CCR5-59029-G/G genotype a protective factor for cardiomyopathy in Chagas disease? *Human Immunology*, 2004, vol. 65, no 7, p. 725-728.

FLÓREZ, Oscar; MARTÍN, Javier; GONZÁLEZ, Clara Isabel. Genetic variants in the chemokines and chemokine receptors in Chagas disease. *Human Immunology*, 2012, vol. 73, no 8, p. 852-858.

FLÓREZ, Oscar, et al. Interleukin-1 gene cluster polymorphism in chagas disease in a Colombian case-control study. *Human Immunology*, 2006, vol. 67, no 9, p. 741-748.

FRADE, Amanda Farage, et al. Polymorphism in the alpha cardiac muscle actin 1 gene is associated to susceptibility to chronic inflammatory cardiomyopathy. *Plos One*, 2013, vol. 8, no 12, p. e83446.

FRADE, Amanda Farage, et al. Genetic susceptibility to Chagas disease cardiomyopathy: involvement of several genes of the innate immunity and chemokine-dependent migration pathways. *BMC Infectious Diseases*, 2013, vol. 13, no 1, p. 1.

FRIEDRICHS, Kai, et al. Induction of atrial fibrillation by neutrophils critically depends on CD11b/CD18 integrins. *Plos One*, 2014, vol. 9, no 2, p. e89307.

GARG, Nisha; POPOV, Vsevolod L.; PAPACONSTANTINO, John. Profiling gene transcription reveals a deficiency of mitochondrial oxidative phosphorylation in *Trypanosoma cruzi*-infected murine hearts: implications in chagasic myocarditis development. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Molecular Basis of Disease*, 2003, vol. 1638, no 2, p. 106-120.

GOMES, J. A. S., et al. Evidence that development of severe cardiomyopathy in human Chagas' disease is due to a Th1-specific immune response. *Infection and Immunity*, 2003, vol. 71, no 3, p. 1185-1193.

GOMES, J. A. S., et al. Impaired phagocytic capacity driven by downregulation of major phagocytosis-related cell surface molecules elicits an overall modulatory cytokine profile in neutrophils and monocytes from the indeterminate clinical form of Chagas disease. *Immunobiology*, 2012, vol. 217, no 10, p. 1005-1016.

GONZÁLEZ, Clara Isabel; MANTILLA, Julio César. *Chagas Heart Disease*. INTECH Open Access Publisher, 2012.

GONZÁLEZ, Julián, et al. Pathogenesis of Chronic Chagasic Myocarditis. *Morbidity and Mortality*, 2013, vol. 3, no 7, p. 9.

GOSWAMI, Sumit. Importance of integrin receptors in the field of pharmaceutical & medical science. *Advances in Biological Chemistry*, 2013, vol. 3, p. 224-252.

GOURBIÈRE, S., et al. Genetics and evolution of triatomines: from phylogeny to vector control. *Heredity*, 2012, vol. 108, no 3, p. 190-202.

GRANGER, D. Neil; SENCHENKOVA, Elena. Inflammation and the Microcirculation. En *Colloquium Series on Integrated Systems Physiology: From Molecule to Function*. Morgan & Claypool Life Sciences, 2010. p. 1-87.

HALL, Stephanie K., et al. Correlation of polymorphic variation in the promoter region of the interleukin-1 $\beta$  gene with secretion of interleukin-1 $\beta$  protein. *Arthritis & Rheumatism*, 2004, vol. 50, no 6, p. 1976-1983.

HAN, Chaofeng, et al. Integrin CD11b negatively regulates TLR-triggered inflammatory responses by activating Syk and promoting degradation of MyD88 and TRIF via Cbl-b. *Nature Immunology*, 2010, vol. 11, no 8, p. 734-742.

HAN, Shizhong, et al. Evaluation of imputation-based association in and around the integrin- $\alpha$ -M (ITGAM) gene and replication of robust association between a non-synonymous functional variant within ITGAM and systemic lupus erythematosus (SLE). *Human Molecular Genetics*, 2009, vol. 18, no 6, p. 1171-1180.

HOTEZ, Peter J., et al. 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, 2013. p. 1-12.

HYNES, Richard O. Integrins: bidirectional, allosteric signaling machines. *Cell*, 2002, vol. 110, no 6, p. 673-687.

Instituto nacional de salud. (2014). Protocolo de vigilancia en salud pública Chagas. INS, Colombia (junio 2014).

Instituto Nacional de Salud, Sivigila. (2015). Vigilancia rutinaria departamental y municipal. INS, Colombia (2015).

Instituto Nacional de Salud. *Protocolo para la vigilancia en salud pública de Chagas*. INT-R02.001.4020-001.

JÄRVINEN, Tiina M., et al. Polymorphisms of the ITGAM gene confer higher risk of discoid cutaneous than of systemic lupus erythematosus. *Plos One*, 2010, vol. 5, no 12, p. e14212.

JIMENEZ, Veronica. Dealing with environmental challenges: mechanisms of adaptation in *Trypanosoma cruzi*. *Research in Microbiology*, 2014, vol. 165, no 3, p. 155-165.

JORGE, Susan EDC, et al. Haptoglobin genotypes in Chagas' disease. *Clinical Biochemistry*, 2010, vol. 43, no 3, p. 314-316.

JUIZ, Natalia A., et al. Human Polymorphisms in Placentally Expressed Genes and Their Association With Susceptibility to Congenital *Trypanosoma cruzi* Infection. *Journal of Infectious Diseases*, 2015, p. jiv561.

KIERSZENBAUM, F.; GOTTLIEB, C. A.; BUDZKO, Delia B. Antibody-independent, natural resistance of birds to *Trypanosoma cruzi* infection. *The Journal of Parasitology*, 1981, p. 656-660.

KIRCHHOFF, Louis V., et al. Parasitic diseases of the heart. *Front Biosci*, 2004, vol. 9, no 706, p. 23.

KWOK, Pui-Yan. *Single nucleotide polymorphisms: methods and protocols*. Springer Science & Business Media, 2003.

LAW, Weng-Giap, et al. Single Nucleotide Polymorphisms (SNPs) of Integrin- $\alpha$ M (ITGAM) Are Associated with Susceptibility to Systemic Lupus Erythematosus (SLE) in an Asian Lupus Cohort. En *Arthritis and Rheumatism*, 2012. p. S963-S964.

LAZZARI, Claudio Ricardo; PEREIRA, Marcos Horacio; LORENZO, Marcelo Gustavo. Behavioural biology of Chagas disease vectors. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, 2013, vol. 108, p. 34-47.

LIM, Jenson; HOTCHIN, Neil A. Signalling mechanisms of the leukocyte integrin  $\alpha M\beta 2$ : current and future perspectives. *Biology of the Cell*, 2012, vol. 104, no 11, p. 631-640.

LUZ, Paola R., et al. Association of L-ficolin levels and FCN2 genotypes with chronic Chagas disease. *Plos One*, 2013, vol. 8, no 4, p. e60237.

MACPHERSON, Matthew, et al. A systemic lupus erythematosus-associated R77H substitution in the CD11b chain of the Mac-1 integrin compromises leukocyte adhesion and phagocytosis. *Journal of Biological Chemistry*, 2011, vol. 286, no 19, p. 17303-17310.

MACHUCA, Mayra Alejandra, et al. SNP/haplotype associations of CCR2 and CCR5 genes with severity of chagasic cardiomyopathy. *Human Immunology*, 2014, vol. 75, no 12, p. 1210-1215.

MAIER, Harald J., et al. Cardiomyocyte-specific I $\kappa$ B kinase (IKK)/NF- $\kappa$ B activation induces reversible inflammatory cardiomyopathy and heart failure. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 2012, vol. 109, no 29, p. 11794-11799.

MAITI, Amit K., et al. Combined protein-and nucleic acid-level effects of rs1143679 (R77H), a lupus-predisposing variant within ITGAM. *Human Molecular Genetics*, 2014, vol. 23, no 15, p. 4161-4176.

MANQUE, Patricio A., et al. Trypanosoma cruzi infection induces a global host cell response in cardiomyocytes. *Infection and Immunity*, 2011, vol. 79, no 5, p. 1855-1862.

MARIAN, Ali J. Molecular genetic studies of complex phenotypes. *Translational Research*, 2012, vol. 159, no 2, p. 64-79.

MARTH, Thomas; KELSALL, Brian L. Regulation of interleukin-12 by complement receptor 3 signaling. *The Journal of Experimental Medicine*, 1997, vol. 185, no 11, p. 1987-1995.

MEANS, Terry K.; LUSTER, Andrew D. Integrins limit the Toll. *Nature Immunology*, 2010, vol. 11, no 8, p. 691.

MENEZES, C. A. S., et al. Phenotypic and functional characteristics of CD28+ and CD28- cells from chagasic patients: distinct repertoire and cytokine expression. *Clinical & Experimental Immunology*, 2004, vol. 137, no 1, p. 129-138.

MESSIAS-REASON, I. J.; URBANETZ, L.; PEREIRA DA CUNHA, C. Complement C3 F and BF S allotypes are risk factors for Chagas disease cardiomyopathy. *Tissue Antigens*, 2003, vol. 62, no 4, p. 308-312.

MILANOVA, Viktoriya; IVANOVSKA, Nina; DIMITROVA, Petya. The effect of interleukin 17 and Toll-like receptor 2 on CD11b expression and apoptosis of neutrophils in zymosan-induced arthritis and paw oedema. *Central European Journal of Immunology*, 2014, vol. 39, no 2, p. 131.

MONTECUCCO, Fabrizio, et al. Tumor necrosis factor-alpha (TNF- $\alpha$ ) induces integrin CD11b/CD18 (Mac-1) up-regulation and migration to the CC chemokine CCL3 (MIP-1 $\alpha$ ) on human neutrophils through defined signalling pathways. *Cellular Signalling*, 2008, vol. 20, no 3, p. 557-568.

MUKHERJEE, Shankar, et al. Alterations in myocardial gene expression associated with experimental *Trypanosoma cruzi* infection. *Genomics*, 2008, vol. 91, no 5, p. 423-432.

National Center for Biotechnology Information – Aceview. Recuperado de <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/ie/research/acembly/>.

NIETO, A., et al. HLA haplotypes are associated with differential susceptibility to *Trypanosoma cruzi* infection. *Tissue Antigens*, 2000, vol. 55, no 3, p. 195-198.

NOGUEIRA, Luciana Gabriel, et al. Myocardial chemokine expression and intensity of myocarditis in Chagas cardiomyopathy are controlled by polymorphisms in CXCL9 and CXCL10. *Plos Negl Trop Dis*, 2012, vol. 6, no 10, p. e1867.

OLIVEIRA, Amanda P., et al. CCR5 chemokine receptor gene variants in chronic Chagas' disease. *International Journal of Cardiology*, 2014, vol. 176, no 2, p. 520-522.

PINAZO, Maria-Jesus; GASCON, Joaquim. The importance of the multidisciplinary approach to deal with the new epidemiological scenario of Chagas disease (global health). *Acta Tropica*, 2015, vol. 151, p. 16-20.

PISSETTI, Cristina Wide, et al. Genetic and functional role of TNF-alpha in the development *Trypanosoma cruzi* infection. *Plos Negl Trop Dis*, 2011, vol. 5, no 3, p. e976.

PORTELLA, Renata Siqueira, et al. Effect of treatment with cyclophosphamide in low doses upon the onset of delayed type hypersensitivity in mice chronically infected with *Trypanosoma cruzi*: involvement of heart interstitial dendritic cells. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, 2013, vol. 108, no 6, p. 691-698.

PY, Marco Oliveira. Neurologic manifestations of Chagas disease. *Current Neurology and Neuroscience Reports*, 2011, vol. 11, no 6, p. 536-542.

RAMASAWMY, Rajendranath, et al. Heterozygosity for the S180L Variant of MAL/TIRAP, a Gene Expressing an Adaptor Protein in the Toll-Like Receptor Pathway, Is Associated with Lower Risk of Developing Chronic Chagas Cardiomyopathy. *Journal of Infectious Diseases*, 2009, vol. 199, no 12, p. 1838-1845.

RAMASAWMY, Rajendranath, et al. BAT1, a putative anti-inflammatory gene, is associated with chronic Chagas cardiomyopathy. *Journal of Infectious Diseases*, 2006, vol. 193, no 10, p. 1394-1399.

RAMASAWMY, Rajendranath, et al. Polymorphisms in the gene for lymphotoxin- $\alpha$  predispose to chronic Chagas cardiomyopathy. *Journal of Infectious Diseases*, 2007, vol. 196, no 12, p. 1836-1843.

REED, Joanne H., et al. Complement Receptor 3 Influences Toll-like Receptor 7/8-Dependent Inflammation IMPLICATIONS FOR AUTOIMMUNE DISEASES CHARACTERIZED BY ANTIBODY REACTIVITY TO RIBONUCLEOPROTEINS. *Journal of Biological Chemistry*, 2013, vol. 288, no 13, p. 9077-9083.

REZZONICO, Roger, et al. Engagement of CD11b and CD11c  $\beta$ 2 integrin by antibodies or soluble CD23 induces IL-1 $\beta$  production on primary human monocytes through mitogen-activated protein kinase-dependent pathways. *Blood*, 2000, vol. 95, no 12, p. 3868-3877.

RIBEIRO, Antonio L., et al. Diagnosis and management of Chagas disease and cardiomyopathy. *Nature Reviews Cardiology*, 2012, vol. 9, no 10, p. 576-589.

RIBEIRO, Antonio Luiz Pinho, et al. Prognostic Value of Signal-Averaged Electrocardiogram in Chagas Disease. *Journal of Cardiovascular Electrophysiology*, 2008, vol. 19, no 5, p. 502-509.

RICARDO-CARTER, Cristina, et al. Leishmania major inhibits IL-12 in macrophages by signalling through CR3 (CD11b/CD18) and down-regulation of ETS-mediated transcription. *Parasite Immunology*, 2013, vol. 35, no 12, p. 409-420.

RHODES, Benjamin, et al. The rs1143679 (R77H) lupus associated variant of ITGAM (CD11b) impairs complement receptor 3 mediated functions in human monocytes. *Annals of the Rheumatic Diseases*, 2012, vol. 71, no 12, p. 2028-2034.

ROBERTS, Amy L., et al. The Complement Receptor 3 (CD11b/CD18) agonist Leukadherin-1 suppresses human innate inflammatory signalling. *Clinical & Experimental Immunology*, 2016, vol 185, no. 3, p. 361-371.

ROBLEDO, G., et al. Association study of PTPN22 C1858T polymorphism in Trypanosoma cruzi infection. *Tissue Antigens*, 2007, vol. 69, no 3, p. 261-264.

RODRIGUEZ, D. A.; GONZÁLEZ, C. I.; MARTIN, J. Analysis of association of FOXO3 gene with Trypanosoma cruzi infection and chronic Chagasic cardiomyopathy. *HLA*, 2016, vol. 87, no 6, p. 449-452.

RODRIGUEZ, Daniel A, et al. Investigation of the role of IL17A gene variants in Chagas disease. *Genes and Immunity*, 2015.

RODRIGUEZ, Daniel A, et al. IL18 Gene Variants Influence the Susceptibility to Chagas Disease. *Plos Negl Trop Dis*, 2016, vol. 10, no 3, p. e0004583.

RODRÍGUEZ-PÉREZ, José Manuel, et al. Tumor necrosis factor-alpha promoter polymorphism in Mexican patients with Chagas' disease. *Immunology Letters*, 2005, vol. 98, no 1, p. 97-102.

ROMAN-CAMPOS, Danilo, et al. Novel insights into the development of chagasic cardiomyopathy: Role of PI3Kinase/NO axis. *International Journal of Cardiology*, 2013, vol. 167, no 6, p. 3011-3020.

ROSENTHAL, Louis A., et al. Leishmania major-human macrophage interactions: cooperation between Mac-1 (CD11b/CD18) and complement receptor type 1 (CD35) in promastigote adhesion. *Infection and Immunity*, 1996, vol. 64, no 6, p. 2206-2215.

ROSS, Gordon D. Regulation of the Adhesion versus Cytotoxic Functions of the Mac-1/CR3/ $\alpha$  M  $\beta$  2-Integrin Glycoprotein. *Critical Reviews™ in Immunology*, 2000, vol. 20, no 3.

ROSETTI, Florencia, et al. Human lupus serum induces neutrophil-mediated organ damage in mice that is enabled by Mac-1 deficiency. *The Journal of Immunology*, 2012, vol. 189, no 7, p. 3714-3723.

SEEGERS, D., et al. A TaqI polymorphism in the 3' UTR of the IL-12 p40 gene correlates with increased IL-12 secretion. *Genes and Immunity*, 2002, vol. 3, no 7, p. 419-423.

SHI, Can, et al. Leukocyte integrin Mac-1 recruits toll/interleukin-1 receptor superfamily signaling intermediates to modulate NF- $\kappa$ B activity. *Circulation Research*, 2001, vol. 89, no 10, p. 859-865.

ŠKOBERNE, Mojca, et al. The apoptotic-cell receptor CR3, but not  $\alpha\beta5$ , is a regulator of human dendritic-cell immunostimulatory function. *Blood*, 2006, vol. 108, no 3, p. 947-955.

SOARES, Milena Botelho Pereira, et al. Gene expression changes associated with myocarditis and fibrosis in hearts of mice with chronic chagasic cardiomyopathy. *Journal of Infectious Diseases*, 2010, vol. 202, no 3, p. 416-426.

SOLOVJOV, Dmitry A.; PLUSKOTA, Elzbieta; PLOW, Edward F. Distinct roles for the  $\alpha$  and  $\beta$  subunits in the functions of integrin  $\alpha M\beta 2$ . *Journal of Biological Chemistry*, 2005, vol. 280, no 2, p. 1336-1345.

SOUZA, Paulo EA, et al. Monocytes from patients with indeterminate and cardiac forms of Chagas' disease display distinct phenotypic and functional characteristics associated with morbidity. *Infection and Immunity*, 2004, vol. 72, no 9, p. 5283-5291.

SOUZA, Paulo EA, et al. Trypanosoma cruzi infection induces differential modulation of costimulatory molecules and cytokines by monocytes and T cells from patients with indeterminate and cardiac Chagas' disease. *Infection and Immunity*, 2007, vol. 75, no 4, p. 1886-1894.

STEVERDING, Dietmar. The history of Chagas disease. *Parasites & Vectors*, 2014, vol. 7, no 1, p. 1.

TEIXEIRA, Antonio RL, et al. Pathogenesis of chagas' disease: parasite persistence and autoimmunity. *Clinical Microbiology Reviews*, 2011, vol. 24, no 3, p. 592-630.

TORRES, Orlando A., et al. Association of the macrophage migration inhibitory factor- 173G/C polymorphism with Chagas disease. *Human Immunology*, 2009, vol. 70, no 7, p. 543-546.

TORRES, Orlando A., et al. Lack of association between IL-6 -174G/C gene polymorphism and Chagas disease. *Tissue Antigens*, 2010 vol. 76, no. 2, p. 131–134.

TORRES, Orlando A., et al. Role of the IFNG+ 874T/A polymorphism in Chagas disease in a Colombian population. *Infection, Genetics and Evolution*, 2010, vol. 10, no 5, p. 682-685.

VARGA, Georg, et al. Active MAC-1 (CD11b/CD18) on DCs inhibits full T-cell activation. *Blood*, 2007, vol. 109, no 2, p. 661-669.

VILLANI, Fernanda Nobre Amaral, et al. Trypanosoma cruzi-Induced Activation of Functionally Distinct  $\alpha\beta$  and  $\gamma\delta$  CD4<sup>-</sup> CD8<sup>-</sup> T Cells in Individuals with Polar Forms of Chagas' Disease. *Infection and Immunity*, 2010, vol. 78, no 10, p. 4421-4430.

VITELLI-AVELAR, D. M., et al. Are increased frequency of macrophage-like and natural killer (NK) cells, together with high levels of NKT and CD4<sup>+</sup> CD25<sup>high</sup> T cells balancing activated CD8<sup>+</sup> T cells, the key to control Chagas' disease morbidity?. *Clinical & Experimental Immunology*, 2006, vol. 145, no 1, p. 81-92.

WEITZEL, Thomas, et al. Mannose-binding lectin and Toll-like receptor polymorphisms and Chagas disease in Chile. *The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, 2012, vol. 86, no 2, p. 229-232.

Weizmann Institute of Science (1996-2016). GeneCards Human Gene Database. Recuperado de <http://www.genecards.org/>.

World Health Organization. (2010). Chagas disease (American trypanosomiasis): Fact Sheet No 340. *WHO, Geneva (June 2010)*.

World Health Organization. (2015). Weekly epidemiological record Relevé épidémiologique hebdomadaire. *WHO, Geneva (February 2015)*.

ZAFRA, German, et al. Polymorphism in the 3' UTR of the IL12B gene is associated with Chagas' disease cardiomyopathy. *Microbes and Infection*, 2007, vol. 9, no 9, p. 1049-1052.

ZAFRA, German, et al. Polymorphisms of toll-like receptor 2 and 4 genes in Chagas disease. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, 2008, vol. 103, no 1, p. 27-30.

ZHOU, Yebin, et al. Multiple Lupus-Associated ITGAM Variants Alter Mac-1 Functions on Neutrophils. *Arthritis & Rheumatism*, 2013, vol. 65, no 11, p. 2907-2916.