



ugr | Universidad
de Granada

ipbln

75
AÑOS



CSIC

CONSEJO SUPERIOR DE INVESTIGACIONES CIENTÍFICAS

Estudio de las bases genéticas de la enfermedad de Chagas

Daniel Arturo León Rodríguez, 2016

Editor: Universidad de Granada. Tesis Doctorales
Autor: Daniel Arturo León Rodríguez
ISBN: 978-84-9163-051-7
URI: <http://hdl.handle.net/10481/44474>

可
可
可
可
可
可
可
可
可
可



Tesis Doctoral

Estudio de las bases genéticas de la enfermedad de Chagas

Memoria presentada por el licenciado en microbiología
Daniel Arturo León Rodríguez para optar al grado de Doctor de la
Universidad de Granada.

Directores: Javier Martín Ibáñez, Profesor de Investigación del CSIC -
España y Clara Isabel González Rugeles, Profesora titular de la
Universidad Industrial de Santander - Colombia.

Instituto de Parasitología y Biomedicina López-Neyra, CSIC.
Granada, España, noviembre de 2016

可
可
可
可
可
可
可
可
可
可

El doctorando Daniel Arturo León Rodríguez y los directores de la tesis Javier Martín Ibáñez y Clara Isabel González Rugeles garantizamos, al firmar esta tesis doctoral, que el trabajo ha sido realizado por el doctorando bajo la dirección de los directores de la tesis y hasta donde nuestro conocimiento alcanza, en la realización del trabajo, se han respetado los derechos de otros autores a ser citados, cuando se han utilizado sus resultados o publicaciones.

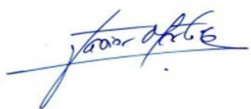
Así mismo, el doctorando Daniel Arturo León Rodríguez y los directores de la tesis Javier Martín Ibáñez y Clara Isabel González Rugeles garantizamos, al firmar esta tesis doctoral, que las publicaciones presentadas no se han utilizado en la defensa de ninguna otra tesis en España u otro país y que no serán utilizadas con tal propósito.

Granada, 20 de septiembre de 2016

Director de la Tesis

Directora de la Tesis

Doctorando



Fdo. Javier Martín
Ibáñez

Fdo. Clara Isabel
González R.

Fdo. Daniel A.
León R.

可
可
可
可
可
可
可
可
可

Agradecimientos

Agradecer es un proceso complejo y difícil, porque muchos han participado en este proceso y mi memoria es muy corta, por lo que trataré de hacer mi mejor esfuerzo...

En primer lugar quiero agradecer al profesor Javier Martín, un gran director de tesis, científico y persona, quien me brindó la gran oportunidad de pertenecer a su grupo de investigación y hacerme partícipe de sus enseñanzas. Por darme valiosos consejos y una gran formación académica y científica, infinitas gracias profesor Martin.

En segundo lugar agradezco a la doctora Clara Isabel González, porque un “sí” suyo me dio la oportunidad de participar en este gran proyecto de investigación, por sus enseñanzas y por siempre estar dispuesta a colaborarme, a ella le agradezco inmensamente.

A Luis Eduardo Echeverría, médico en nuestro proyecto, su ayuda fue indispensable.

A los chicos y chicas de laboratorio que nombro a continuación: a Eguz, quien me enseñó y orientó en las cosas básicas del laboratorio, gracias por el tiempo que dedicó a esta tarea; a Lara, sin lugar a dudas una de las personas más brillantes que he conocido, gracias por todos los consejos; a David, un gran científico y en gran medida también un gran maestro, a él también debo gran parte de mi formación; a Elena, una gran compañera de causa, nunca olvidaré que ella con una mirada decía mucho; a Mari y a Lourdes, con quienes fundamos la tradición del fika en el labo, y me

ayudaron mucho, sobre todo en la parte final de este proceso; a Ana, una persona muy calmada quien nunca me negó cualquier favor que le solicité, Marquitos tendrá sin ninguna duda una gran madre (y un gran padre, ¡obvio!); a Gema, por su gran sabiduría y visión del mundo, una persona que quien la conoce, sabe el gran ser humano que es; a Sonia y a Sofía, quienes dieron soporte al proyecto y quienes por su humildad y entrega ayudan al avance de la ciencia; a David/J, quien participó del proyecto y fue un gran aprendiz, le deseo un gran éxito en ese nuevo camino que va a emprender; a Martin, como le digo yo, el alegre alemán, que siempre tiene una sonrisa para todo; a Diana, Aurora, Arkaitz, Nezha, Ezequiel y otros tantos con quienes compartí durante mi paso por el instituto.

A mis amigos en Colombia, el Kopo, el profe, Leonardo (cuyo alias no puedo escribir acá), Felipe (lo mismo), Juanito Godínez el burócrata, Camilo, Camila, María Catalina, María Andrea, Kelly, Nancy, Lili-lili-little-lili, Violetinha, Eliecer curramba tu papá, y a tantos, quienes me conocen y sabían lo que implicaba alejarme, a ellos les doy gracias por el apoyo a la distancia.

A mi familia, mis padres, mi hermana, mi cuñado Rodríguez, mis suegros y mis cuñados Taylor, quienes siempre creyeron en mí y que nunca dejaron de dar su voz de aliento.

También quiero dar un especial agradecimiento al Departamento Administrativo de Ciencia, Tecnología e Innovación - Colciencias, y a su directora, la doctora Yaneth Giha Tovar y a la Fundación para el futuro de Colombia - Colfuturo, e igualmente a su director, el doctor Jerónimo Castro, por otorgarme esta oportunidad y por los recursos que me brindaron para poder realizar mis estudios de doctorado, o mejor dicho, lograr mi sueño de ser doctor.

Finalmente, quiero agradecer a la persona más importante de mi vida, a Viviana, mi compañera, mi cómplice, mi confidente y mi mejor amiga, porque ella estuvo en el momento en el que apliqué a la beca, cuando abordé el avión en el aeropuerto, en el momento en que aceptaron el primer paper y ahora, mi fiel esposa y compañera, eres la gran impulsora de este proyecto.

可
可
可
可
可
可
可
可
可
可
可

Índice

1. Abreviaturas.....	1
2. Resumen.....	5
3. Introducción.....	9
3.1. Enfermedad de Chagas.....	9
3.1.1. Ciclo de vida de <i>Trypanosoma cruzi</i>	11
3.1.2. Fases de la enfermedad de Chagas.....	13
3.1.3. Respuesta inmune a la infección por <i>Trypanosoma cruzi</i>	16
3.2. Estudio de las bases genéticas de las enfermedades infecciosas.....	21
3.2.1. Marcadores genéticos y tipos de estudio de riesgo genético.....	22
3.2.1.1 Marcadores genéticos.....	22
3.2.1.2. Tipos de estudio para la evaluación del riesgo genético.....	25
3.2.2. Estudio de los factores genéticos en enfermedades infecciosas.....	28
3.3. Genética de la enfermedad de Chagas: Estudios previos....	32
3.4. Genes analizados en el presente estudio.....	39
3.4.1. Genes de interleuquinas inflamatorias: <i>IL17A</i> e <i>IL18</i>	39
3.4.1.1. <i>IL17A</i>	39
3.4.1.2. <i>IL18</i>	41

3.4.2. Genes relacionados con la regulación de la respuesta inmune-inflamatoria: <i>FOXO3</i> , <i>VDR</i> y <i>TYK2</i>	42
3.4.2.1. <i>FOXO3</i>	42
3.4.2.2. <i>VDR</i>	43
3.4.2.3. <i>TYK2</i>	44
4. Hipótesis y justificación.....	47
5. Objetivos.....	49
5.1. Objetivos general.....	49
5.2. Objetivos específicos.....	49
6. Diseño experimental.....	51
6.1. Selección de individuos y clasificación.....	51
6.2. Extracción de ADN y genotipado de polimorfismos de los genes candidatos.....	54
6.2.1. Extracción de ADN.....	54
6.2.2. Selección de polimorfismos a analizar.....	54
6.2.2.1. <i>IL17A</i>	54
6.2.2.2. <i>IL18</i>	55
6.2.2.3. <i>FOXO3</i>	56
6.2.2.4. <i>VDR</i>	57
6.2.2.5. <i>TYK2</i>	58
6.2.3. Genotipado de muestras.....	59
6.3. Análisis estadístico.....	62

7. Publicaciones.....	65
7.1. Investigation of the role of <i>IL17A</i> gene variants in Chagas disease.....	67
7.2. <i>IL18</i> Gene Variants Influence the Susceptibility to Chagas Disease.....	75
7.3. Analysis of association of <i>FOXO3</i> gene with <i>Trypanosoma cruzi</i> infection and chronic Chagasic cardiomyopathy.....	95
7.4. Evaluation of <i>VDR</i> gene polymorphisms in <i>Trypanosoma cruzi</i> infection and chronic Chagasic cardiomyopathy.....	103
7.5. Analysis of <i>TYK2</i> gene variants in the susceptibility to Chagas Disease.....	113
8. Discusión.....	143
8.1. Resumen de resultados.....	143
8.1.1. <i>IL17A</i>	143
8.1.2. <i>IL18</i>	144
8.1.3. <i>FOXO3</i>	145
8.1.4. <i>VDR</i>	145
8.1.5. <i>TYK2</i>	146
8.2. Variantes genéticas y susceptibilidad a infección por <i>Trypanosoma cruzi</i>	148
8.3. Variantes genéticas y susceptibilidad a desarrollo de cardiomiopatía Chagásica crónica de individuos seropositivos a <i>T. cruzi</i>	152
8.4. Análisis conjunto de genes asociados a riesgo de infección y/o desarrollo de cardiomiopatía Chagásica crónica en población endémica colombiana.....	156

8.5. Análisis de genes asociados a infección y/o fenotipos severos de la enfermedad de Chagas en resultados reportados en población endémica brasileña.....	168
8.6. Comparación de los resultados obtenidos en estudios de susceptibilidad genética de otras enfermedades infecciosas con enfermedad de Chagas.....	172
9. Perspectivas.....	179
10. Conclusiones.....	185
11. Referencias.....	189

可
可
可
可
可
可
可

*“La ciencia es una sola luz, e iluminar con ella cualquier parte, es
iluminar con ella el mundo entero”.*

Isaac Asimov

*“La ciencia se compone de errores, que a su vez, son los pasos hacia la
verdad”.*

Julio Verne

可
可
可
可
可
可
可
可
可
可

A Viviana, el amor de mi vida, quien me acompañó en esta etapa de mi
carrera, me aconsejó y siempre supo escucharme

A mis padres y a mi hermana

A la memoria del buen Abelardo y de otros que ya no están

可
可
可
可
可
可
可
可
可
可

1. Abreviaturas

ADN	Ácido desoxirribonucleico
ARN	Ácido ribonucleico
BH	Prueba de Benjamini y Hochberg
CCL2	Ligando de quimiocina con motivo C-C tipo 2
CCL7	Ligando de quimiocina con motivo C-C tipo 7
CCR2	Receptor de quimiocinas C-C tipo 2
CCR5	Receptor de quimiocinas C-C tipo 5
CLM	Población colombiana de Medellín en proyecto 1000 genomas
CNV	Variantes de número de copias
CXCL1	Ligando de quimiocina con motivo C-X-C tipo 1
CXCL5	Ligando de quimiocina con motivo C-X-C tipo 5
DARC	Alelo de receptor de quimiocinas Duffy
EGFr	Receptor de factor de crecimiento epidérmico
eQTLs	Loci de rasgo cuantitativo de expresión
FDR	Tasa de falsos descubrimientos
FOXO3	Caja fork-head O3
GPI	Glicosilfosfatidilinositol
GPL	Fosfolípidos de glicoinositol
GWAS	Estudio de asociación de genoma completo
HBB	Hemoglobina beta
HLA	Antígeno leucocitario humano

IFN- γ	Interferón gama
IgG	Inmunoglobulina G
IgM	Inmunoglobulina M
IL	Interleuquina
IL-17A	Interleuquina 17A
IL-18	Interleuquina 18
KIR	Receptor similar a inmunoglobulina de células asesinas naturales
LB	Linfocitos B
LD	Desequilibrio de ligamiento
LDLr	Receptor de lipoproteínas de baja densidad
LT	Linfocitos T
MAF	Frecuencia del alelo minoritario
MHC-I	Complejo mayor de histocompatibilidad I
MIF	Factor inhibidor de migración de macrófagos
NK	Células asesinas naturales
OMS	Organización Mundial de la Salud
OPS	Organización Panamericana de la Salud
OR	Razón de momios (Odds Ratio)
<i>P. falciparum</i>	<i>Plasmodium falciparum</i>
<i>P. malariae</i>	<i>Plasmodium malariae</i>
<i>P. ovale</i>	<i>Plasmodium ovale</i>
<i>P. vivax</i>	<i>Plasmodium vivax</i>
PAMPs	Patrones moleculares asociados a patógenos
PCR	Reacción en cadena de la polimerasa

ROS	Especies reactivas de oxígeno
SIDA	Síndrome de inmunodeficiencia adquirida
SNP	Polimorfismo de nucleótido sencillo
STRING	Herramienta de búsqueda para la obtención de genes/proteínas interactuantes
<i>T. cruzi</i>	<i>Trypanosoma cruzi</i>
TGFr	Receptor de factor de crecimiento tumoral
TGF- β 1	Factor transformante beta 1
Th1	Linfocitos T ayudadores tipo 1
Th17	Linfocitos T ayudadores tipo 17
Th2	Linfocitos T ayudadores tipo 2
TLR	Receptor tipo Toll
TLR2	Receptor tipo Toll 2
TLR4	Receptor tipo Toll 4
TNF- α	Factor de necrosis tumoral alfa
TYK2	Quinasa tirosina 2
VDR	Receptor de vitamina D
VIH	Virus de la inmunodeficiencia humana
VNTRs	Número variable de repeticiones en tándem

河
河
河
河
河
河
河
河
河
河

2. Resumen

La enfermedad o mal de Chagas es una enfermedad infecciosa causada por el protozoo flagelado *Trypanosoma cruzi*. Esta enfermedad es endémica de América Latina, donde se estima que unos 120 millones de personas habitan zonas de alta transmisión, con 6 millones de infectados actualmente. Esta enfermedad posee dos fases claramente identificadas que corresponden a la fase aguda y a la fase crónica. La fase aguda se presenta poco tiempo después de la infección y se caracteriza por presencia de síntomas tales como fiebre, malestar general, altos niveles de parasitemia en sangre, entre otros. Esta primera fase dura unas cuantas semanas, dando luego paso a la segunda fase de la enfermedad conocida como fase crónica. En esta fase, la mayoría de individuos se vuelven asintomáticos y mueren de causas diferentes a la enfermedad de Chagas. No obstante, se estima que un 30% de las personas desarrollan una o las dos formas severas de la enfermedad, la cardiomiopatía Chagásica crónica y/o la forma digestiva, siendo la primera forma la que más produce fallecimientos relacionados con la enfermedad. Las causas exactas de la aparición de complicaciones crónicas no se conocen con exactitud, aunque se cree que factores genéticos de los individuos pueden estar involucrados en la susceptibilidad diferenciada.

Estudios previos desarrollados en distintas poblaciones endémicas han hallado que diferentes variantes genéticas, localizadas en genes de la respuesta inmune/inflamatoria, están asociadas tanto a riesgo de infección por *T. cruzi* como a riesgo de aparición de complicaciones crónicas de la enfermedad. Es por esto que en la presente tesis doctoral se profundiza en el conocimiento de las bases genéticas de la enfermedad de Chagas

analizando, por medio de estudios de genes candidatos, nuevos marcadores de riesgo genético, tanto a riesgo de infección por *T. cruzi* como a riesgo de aparición de cardiomiopatía Chagásica crónica, en muestras de individuos provenientes de una región endémica del nordeste de Colombia. Los genes seleccionados para el presente estudio fueron *IL17A*, *IL18*, *FOXO3*, *VDR* y *TYK2*.

De acuerdo a los resultados obtenidos, las variantes alélicas de dos genes, *IL17A* e *IL18*, parecen influir el riesgo de infección de los individuos de esta área endémica, mientras que por otra parte las variantes alélicas localizadas en tres genes, *IL17A*, *VDR* y *TYK2*, parecen afectar la susceptibilidad de los pacientes a desarrollar la cardiomiopatía Chagásica crónica. Adicionalmente, los hallazgos de la presente tesis al ser analizados junto con resultados previos de variantes de genes de la respuesta inmune/inflamatoria asociadas tanto a infección como a cardiomiopatía Chagásica crónica en población colombiana, permitieron encontrar una red de interacción compleja entre los distintos marcadores de riesgo genético.

En conclusión, los resultados presentados en esta tesis doctoral muestran que efectivamente existen factores genéticos que pueden estar asociados a la susceptibilidad a riesgo de infección por *T. cruzi* y/o al desarrollo de cardiomiopatía Chagásica crónica. El trabajo aquí presentado abre un campo potencial de estudio, en donde ciertos marcadores genéticos pueden ser utilizados como biomarcadores de riesgo para la enfermedad de Chagas.

河
河
河
河
河
河
河
河

3. Introducción

3.1. Enfermedad de Chagas

La enfermedad de Chagas debe su nombre al médico de origen brasileño Carlos Chagas, quien en 1909 describió la enfermedad, su agente etiológico y su ciclo de vida (1, 2). Esta enfermedad parasitaria es causada por el protozoo flagelado *Trypanosoma cruzi*, el cual es transmitido por las heces de insectos hematófagos triatomíneos (2, 3). El mal de Chagas es endémico en América Latina, en una vasta región que va desde el norte de Argentina, pasando por América central hasta llegar al norte de México. Se estima que en la actualidad, de acuerdo a reportes epidemiológicos, unos 120 millones de personas viven en regiones con alta transmisión vectorial (4). La enfermedad de Chagas se ha asociado a la pobreza, ya que los insectos que la transmiten permanecen en viviendas rurales, con una infraestructura deficiente y que en muchos casos carecen de elementos básicos (5).

De acuerdo a los datos de la Organización Mundial de la Salud (OMS), se calcula que alrededor de 6 millones de personas están actualmente infectadas. Los países que presentan el mayor número de casos estimados según un reporte de 2015 son México, Brasil y Argentina con más de 3 millones y medio, seguidos de Bolivia con casi 610.000 casos. En Colombia, la prevalencia es de aproximadamente 437.000 casos. Los países con mayor número de reportes por transmisión vectorial son Bolivia, Colombia y México con casi 20.000. Además, México y Colombia, junto con Argentina, reportan el mayor número de casos por

transmisión congénita con más de 4.200 reportes. Las tasas de incidencia por 100 habitantes más altas son las de Paraguay (0,340), Belice (0,333), Ecuador (0,317), Bolivia (0,235) y Argentina (0,210) (4). En los últimos años, esta enfermedad se ha convertido en un problema de salud pública a nivel mundial, dadas las altas tasas de migración desde los países endémicos a países desarrollados tales como Estados Unidos, España, Italia y Francia, entre otros (**Figura 1**) (5, 6).

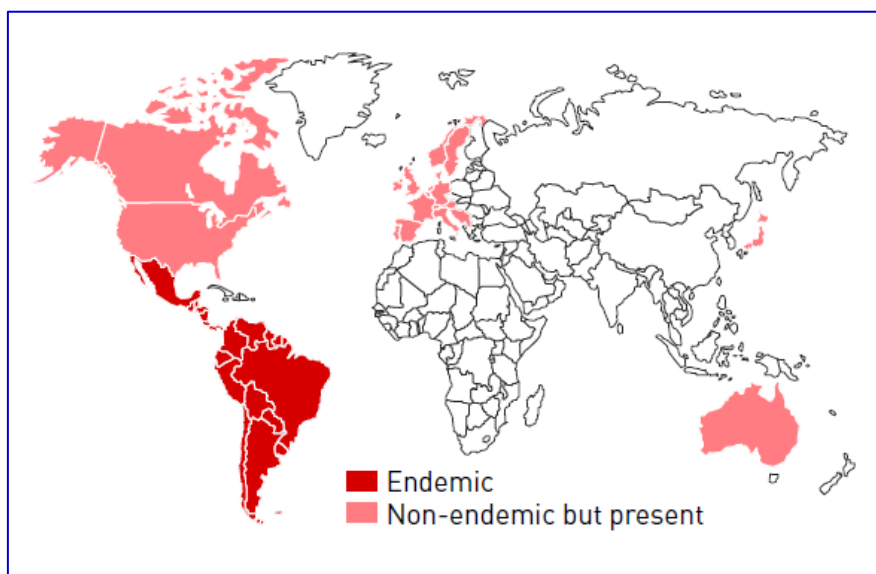


Figura 1. Mapa que representa los países endémicos para la enfermedad de Chagas en rojo y países no endémicos pero con reportes de pacientes seropositivos en rosa. Tomado de <http://www.dndi.org/diseases-projects/chagas/>

Para el tratamiento de la enfermedad de Chagas solo existen dos medicamentos que han mostrado una eficacia limitada contra el parásito, Nifurtimox y Benznidazole (3). Ambos medicamentos reducen la severidad de los síntomas en la fase aguda de la enfermedad, sin embargo, reportes recientes han demostrado que poseen una efectividad limitada en pacientes crónicos, además de tener una alta toxicidad. Adicionalmente,

pocos pacientes son diagnosticados en etapa temprana lo que dificulta la aplicación de los tratamientos (3, 7, 8), razón por la cual se hace necesaria la realización de estudios de tipo preventivo, como las investigaciones con biomarcadores que permitan una clasificación adecuada de los pacientes de acuerdo al riesgo de desarrollo de síntomas severos de la enfermedad.

3.1.1. Ciclo de vida de *Trypanosoma cruzi*

Similar a otros agentes parasitarios protozoarios, el ciclo de vida del *T. cruzi* es complejo e incluye varios estadios y dos hospederos, uno vertebrado y otro invertebrado. El ciclo comienza cuando los tripomastigotes metacíclicos entran en el torrente sanguíneo del hospedero vertebrado a través de una herida. Inmediatamente después de esto, los tripomastigotes infectan células epiteliales donde se transforman en amastigotes, y se multiplican dentro de estas células por fisión binaria. Al pasar varios ciclos de multiplicación por fisión binaria, algunos amastigotes se transforman en tripomastigotes, que entran en el torrente sanguíneo donde migran a otros tejidos, entre los cuales se destacan el tejido cardíaco y tejidos de sistema digestivo, donde una vez infectadas las células, vuelven a transformarse en amastigotes y multiplicarse por fisión binaria. Algunos de estos tripomastigotes circulantes pueden ser absorbidos mediante la picadura de los insectos triatomínicos. Una vez ingeridos por los insectos a través de la picadura, los tripomastigotes migran al intestino del insecto donde se transforman en epimastigotes. Allí, se multiplican por fisión y luego de varios ciclos migran a la parte final del intestino donde se transforman en tripomastigotes metacíclicos y son expulsados a través de las heces de los insectos. Estas formas del parásito pueden permanecer un tiempo sobre la piel del hospedero

infectado y entrar al torrente sanguíneo a través de heridas donde comienzan una vez más su ciclo de vida en el hospedero vertebrado (Figura 2) (3, 5).

Otras formas de infección incluyen desde la ingesta de alimentos infectados con heces del insecto o transfusiones sanguíneas, lo cual ha promovido la creación de programas de tamizaje, para posibles donantes de sangre que habiten o hayan habitado en regiones endémicas (5).

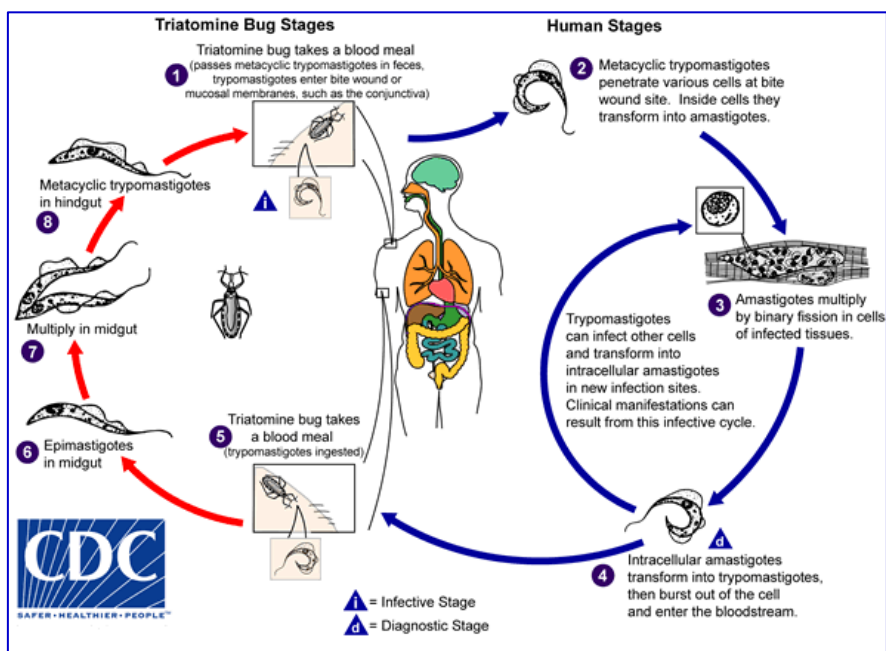


Figura 2. Ciclo de vida de *T. cruzi*. Tomado de <http://www.cdc.gov/parasites/chagas/biology.html>

3.1.2. Fases de la enfermedad de Chagas

La enfermedad de Chagas presenta dos fases claramente identificadas. La primera es la fase aguda, que ocurre en un lapso de aproximadamente dos semanas luego de la infección y se extiende por un periodo de tiempo que comprende entre unas 4 a 8 semanas. La siguiente es la fase crónica, la cual puede presentar dos formas, la forma asintomática y la forma sintomática cardíaca y/o digestiva (**Figura 3**) (2, 3).

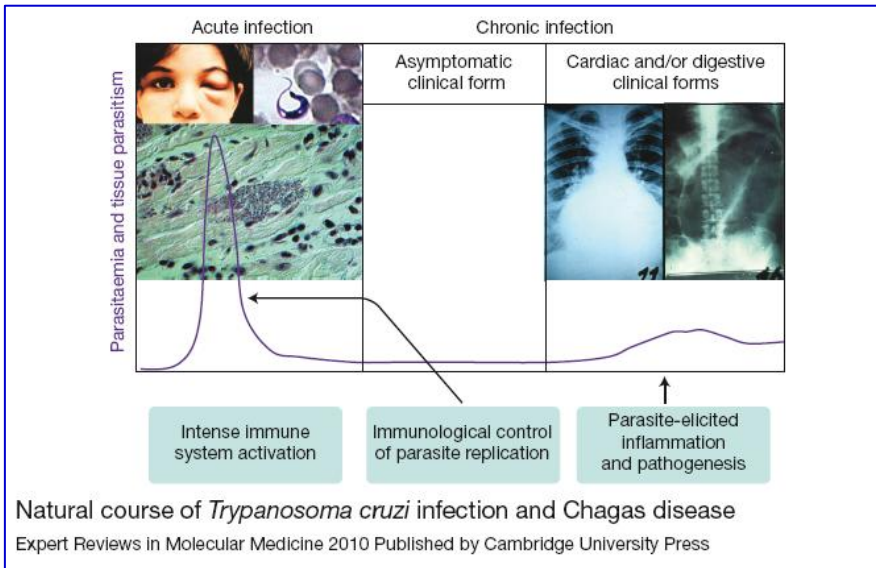


Figura 3. Fases de la infección de *T. cruzi*. Tomado de (2).

La fase aguda es caracterizada por altos niveles de parasitemia en sangre. En esta parte de la enfermedad, los individuos afectados suelen presentar diversos síntomas entre los que se encuentran fiebre, malestar general, hepatoesplenomegalia, y algunas veces linfocitosis atípica (3, 5). En ciertos casos particulares, los pacientes presentan nódulos en la piel conocidos como chagomas, y si el sitio de la infección se encuentra cerca

al tejido ocular, los individuos pueden presentar edemas conocidos como signo de Romaña (3, 5). Debido a la poca especificidad de los síntomas en esta fase, la enfermedad es rara vez diagnosticada, lo que en gran parte dificulta su tratamiento.

Una vez concluida la fase aguda, los niveles de parasitemia en sangre bajan y los pacientes pasan a la fase crónica de la enfermedad. En esta etapa la mayoría de individuos permanecen asintomáticos y en muchos casos mueren de causas diferentes a la enfermedad de Chagas (2, 3, 5). Sin embargo, entre el 20 y 30% de las personas desarrollan una o las dos formas sintomáticas crónicas graves de la enfermedad, las cuales corresponden a la cardiomiopatía Chagásica crónica, siendo esta la más frecuente y que reviste mayor gravedad (3, 5), y la forma digestiva, que involucra la afección del sistema digestivo y da lugar a formas tales como megacolon (2, 3, 5). No obstante, es importante tener en cuenta que pueden pasar décadas hasta que aparezcan dichas formas severas de la enfermedad. Los países con mayor número de casos de cardiomiopatía Chagásica crónica son Argentina (~376.000), Brasil (~231.000), Colombia (~131.000) y Bolivia (~122.000) (4).

La cardiomiopatía Chagásica crónica se manifiesta inicialmente por signos relacionados con el trastorno del ritmo cardiaco tales como defectos en el sistema de conducción eléctrica cardiaca, particularmente bloqueos de la rama derecha o bloqueo fascicular izquierdo. Otro signo temprano de la cardiomiopatía Chagásica crónica es la contracción ventricular prematura, sin embargo, es difícil detectarlo sin la ayuda de un electrocardiograma. El grado de afección de los individuos avanza con el tiempo a signos más severos como cardiomegalia, cardiomiopatía dilatada y falla cardiaca congestiva. En esta fase se presentan problemas tales como la formación de aneurismas, trombos, y paros cardiacos, los que

repercuten directamente en la calidad y esperanza de vida de los pacientes (3).

La forma digestiva de la enfermedad se caracteriza por la afección del esófago y/o colon. Los signos de esta forma pueden pasar desde problemas de movilidad intestinal leves asintomáticos, hasta problemas graves tales como megaesófago que tiene síntomas como disfagia, odinofagia, reflujo, pérdida de peso, aspiración, tos y regurgitación. Por otra parte, el megacolon se caracteriza por problemas como constipación prolongada, fecaloma, vólvulo e isquemia intestinal (3). Esta forma de la enfermedad es menos común que la cardiomiopatía Chagásica crónica, y se presenta principalmente en los países del cono sur de América Latina tales como Argentina, Bolivia, Chile, Paraguay, Uruguay y la parte sur de Brasil (3, 5).

Las causas de la aparición de las formas crónicas de la enfermedad de Chagas no se conocen con exactitud. Uno de los motivos más estudiados es la persistencia parasitaria, ya que en los individuos que presentan dichas formas, se encuentran parásitos en los tejidos afectados (3). La respuesta inmune inflamatoria del hospedero parece ser la causa central del avance de la enfermedad, sin embargo, dicha respuesta es crucial en la parte inicial de la infección. Es por esto que se cree que la aparición o no de las formas severas tales como cardiomiopatía Chagásica crónica dependen en gran medida de un delicado balance en la respuesta inmune de los individuos en la enfermedad de Chagas (3, 6, 9, 10), la cual se aborda a continuación.

3.1.3. Respuesta inmune a la infección por *Trypanosoma cruzi*

La respuesta inmune a la infección por *T. cruzi* depende tanto de la respuesta inmune innata como la respuesta inmune adaptativa. Dicha respuesta involucra células tales como macrófagos, células dendríticas, células asesinas naturales (NK), linfocitos B (LB) y linfocitos T (LT). Adicionalmente, se ha descrito el papel crucial que juega la producción de diversas citoquinas proinflamatorias tales como interferón gama (IFN- γ), factor de necrosis tumoral alfa (TNF- α) e interleuquina 12 (IL-12), entre otras (**Figura 4**) (2, 11).

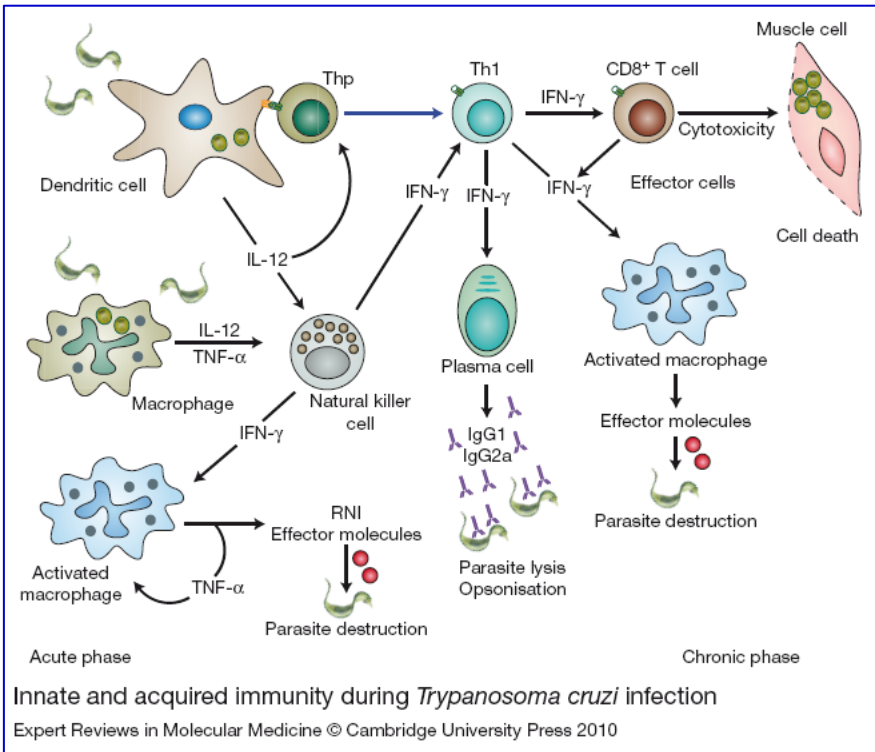


Figura 4. Esquema que representa la respuesta inmune innata y adquirida ante la infección con *T. cruzi*. Tomado de (2).

En primer lugar, una vez ocurre la infección, las células del sistema innato reconocen al parásito a través de lo que se conoce como PAMPs, o patrones moleculares asociados a patógenos, por medio de receptores de tipo Toll (TLR). Diferentes moléculas presentes en las membranas del parásito, tales como anclas de Glicosilfosfatidilinositol (GPI) y fosfolípidos de glicoinositol (GIPLs), e islas no metiladas de ADN CpG, se unen a distintos tipos de TLR presentes en macrófagos, NK y células dendríticas, induciendo la producción de IL-12, TNF- α , IFN- γ y especies reactivas de oxígeno (ROS). Esta respuesta inflamatoria controla la replicación del parásito en el individuo y sirve como puente hacia la respuesta inmune adaptativa. Sin embargo, se ha visto que una respuesta inflamatoria no controlada puede causar daño en los tejidos circundantes, agrandamiento de células tales como cardiomiocitos y finalmente estar implicada en el desarrollo de la cardiomiopatía Chagásica crónica (2).

De forma similar a otros parásitos intracelulares y protozoarios, *T. cruzi* induce una respuesta inmune adaptativa de tipo Th1. Esta respuesta es fuerte y persistente y es crucial para la defensa del hospedador ante el parásito. No obstante, si esta respuesta no es controlada, puede traer efectos colaterales, como por ejemplo, daño de tejidos adyacentes a los sitios de invasión generando una inmunopatogénesis (2).

Una característica importante en la respuesta inmune a *T. cruzi* es la presencia de linfocitos T, CD4+ y CD8+. Por un lado, los linfocitos CD8+ ayudan en el control del parásito por medio de la producción de la citoquina pro-inflamatoria IFN- γ , (2), así como por medio de actividad citotóxica en contra de la célula hospedadora (12, 13). Sin embargo, se ha observado que en pacientes con compromiso cardiaco hay una elevada cantidad de estas células, por lo que se cree que podrían estar involucradas

en la destrucción de los tejidos (2, 11). Por otra parte, los linfocitos CD4⁺ son células claves en la respuesta inmune celular a la infección; pueden producir tanto citoquinas pro-inflamatorias tales como IFN- γ y TNF- α , como citoquinas reguladoras tales como IL-4 e IL-10 (11). Esta dualidad puede ser crucial en la aparición de síntomas graves en la fase crónica de la enfermedad, ya que se ha observado que los pacientes con cardiomiopatía Chagásica crónica tienen un perfil de citoquinas predominantemente pro-inflamatorias (2, 11).

Los parásitos invaden distintos tipos celulares mediante el reconocimiento de distintos receptores de membranas entre los cuales se pueden destacar receptor de factor de crecimiento epidérmico (EGFr), receptor de factor de crecimiento tumoral (TGFr), quininas, receptores de tirosinas quininas, y receptores de lipoproteínas de baja densidad (LDLr) (11). Una vez la célula es invadida, ocurre un reclutamiento de lisosomas que forman una vacuola parasitófora. No obstante, *T. cruzi* escapa de dicha vacuola hacia el citosol donde ocurre la transformación a amastigote. Durante este momento en el ciclo de la infección, los antígenos parasitarios van a estar disponibles en cantidades suficientes para permitir un procesamiento por parte de la maquinaria celular para llevar a cabo una presentación con moléculas del complejo mayor de histocompatibilidad tipo I (MHC-I) (2).

Después de un periodo de 15 días aparecen las células B circulantes activadas. En ese momento son detectables anticuerpos IgM, lo cual sirve como elemento de diagnóstico de la enfermedad. Finalmente, se da la aparición de anticuerpos IgG, que permanecen en los individuos incluso después de que el parásito ha sido eliminado del organismo (11). El papel de los anticuerpos en la respuesta inmune a *T. cruzi* es principalmente controlar la replicación y expansión del parásito en el individuo (2), sin embargo, se han caracterizado ciertos anticuerpos que pueden reconocer

proteínas propias del hospedero, entre los cuales se encuentran anticuerpos anti-miosina y anti receptor adrenergico beta, lo que puede contribuir al daño de tejidos en los pacientes a largo plazo (11).

Como se mencionaba anteriormente, gran parte de los individuos después de pasar por la fase aguda de la enfermedad entran en la forma crónica asintomática, en donde a pesar de permanecer seropositivos durante toda su vida, no desarrollan ninguna anomalía asociada a la enfermedad de Chagas (3, 5). Por otro lado, los pacientes que desarrollan tanto la cardiomiopatía crónica Chagásica como la forma digestiva presentan unos niveles altos de citoquinas pro-inflamatorias tales como IFN- γ , lo cual se ha postulado como una posible causa del daño de los tejidos afectados (11). Debido a la carencia de métodos sensibles de detección, incluso se llegó a plantear que la enfermedad de Chagas podía ser una enfermedad de tipo autoinmune (14), pero con la aparición de métodos moleculares se ha observado que la persistencia parasitaria parece ser, junto con un perfil pro-inflamatorio de citoquinas, la causa de la aparición de las formas severas de Chagas (9, 10, 14).

Teniendo en cuenta la particularidad del perfil de la respuesta inmune en la enfermedad de Chagas, especialmente de la respuesta inflamatoria, y de que el balance de esta respuesta depende en gran medida de la aparición de síntomas crónicos en individuos expuestos a la infección, los estudios de susceptibilidad genética han tenido gran interés en analizar genes de la respuesta inmune/inflamatoria y cómo estos genes pueden conferir susceptibilidad diferencial, tanto a la infección, como al desarrollo de cardiomiopatía Chagásica crónica o forma digestiva.

A continuación, se hará un repaso previo de las bases genéticas de las enfermedades infecciosas y posteriormente se mostrarán los resultados

previos de estudios de genética en enfermedad de Chagas, principalmente enfocados en población colombiana, que es la población objeto del presente estudio.



3.2. Estudio de las bases genéticas de las enfermedades infecciosas

Las enfermedades infecciosas son definidas como desórdenes causados en los individuos por la colonización de un organismo patógeno. En los últimos años, grandes avances en la medicina han permitido entender de una mejor manera como los microorganismos invasores causan los diferentes síntomas de dichas enfermedades (15). Trabajos de científicos como los de Louis Pasteur y Robert Koch han sido de gran ayuda para comprender la dinámica observada durante las infecciones, contribuyendo a lo que se conoce en la actualidad como la “Teoría microbiana de la enfermedad” (15-17).

No obstante, durante los últimos años se ha observado que no todos los individuos expuestos a una infección desarrollan las enfermedades con la misma sintomatología o gravedad (17, 18). Uno de los primeros estudios realizado con hijos adoptados demostró que el riesgo de mortalidad por una enfermedad infecciosa en un hijo adoptado se incrementaba 5.8 veces, si uno de los padres biológicos había muerto a causa de una patología infecciosa antes de los 50 años de edad (19). Este hallazgo fue posteriormente reforzado con otra investigación, en la cual un estudio de cohortes con datos de individuos adoptados mostró que el riesgo de mortalidad por infección de un individuo determinado se incrementaba si un hermano biológico o medio-hermano biológico había muerto también por una infección (20). Más tarde, otro estudio con tuberculosis demostró que existían diferencias raciales en cuanto a susceptibilidad a la enfermedad, en donde individuos de ascendencia africana presentaban un riesgo incrementado si se comparaba con individuos de ascendencia europea (21).

Debido a esto, se ha planteado que factores genéticos en los individuos, pueden influir en el riesgo de padecer una enfermedad infecciosa y/o riesgo de sufrir una sintomatología grave, relacionada con dicha enfermedad (17, 18, 22-25). A continuación se describen brevemente los marcadores y los estudio de factores de riesgo genético, involucrados en distintas enfermedades infecciosas.

3.2.1 Marcadores genéticos y tipos de estudio de riesgo genético

3.2.1.1 Marcadores genéticos

El mismo Louis Pasteur habló de la importancia de los factores no microbianos, incluida la constitución hereditaria del hospedador, en la susceptibilidad a la infección (16). Uno los mayores retos del siglo XXI ha sido describir la base genética hereditaria de las enfermedades (24). Sin lugar a duda, un gran avance en la investigación genética ha sido la descripción de la secuencia completa del genoma humano en 2001 (26, 27). Esto sirvió como base y utilizando esta información como referencia, estudios a gran escala han sido llevados a cabo para anotar las distintas variaciones genéticas que se encuentran en distintos individuos (24). A partir de estos análisis, se han caracterizado distintos tipos de marcadores genéticos de gran utilidad para elaborar estudios de asociación genética.

Dentro de los marcadores de mayor utilidad, encontramos inicialmente los VNTRs (Variable number of tandem repeats). Estos marcadores son pequeñas secuencias repetitivas de ADN, las cuales se clasifican de

acuerdo a su tamaño como mini-satélites o micro-satélites (28). Otro tipo de marcador encontrado en el genoma y que más recientemente también han sido utilizados son las variantes de número de copias o CNV (Copy number variations). Los CNV son definidos como segmentos de ADN con una longitud mayor o igual a un 1kb y que presentan un número de copias variables comparados con un genoma de referencia (29). No obstante, los marcadores por excelencia en los estudios genéticos son los polimorfismos de nucleótido sencillo o SNP (Single nucleotide polymorphism) (30). Este tipo de variantes como su nombre indica, son cambios puntuales de una base por otra en una posición determinada del ADN, y son el tipo de variante más común, llegando a una cifra de unos 10 millones de polimorfismos en el genoma de un mismo individuo, lo que ha potenciado su utilización en diferentes estudios (28). En los últimos años, varias iniciativas internacionales han creado mapas de SNPs en el genoma de distintas poblaciones, lo que ha permitido que sean usadas como herramientas de referencia para los estudios de asociación genética. Dentro de dichas iniciativas internacionales, se encuentran el proyecto HapMap (31) y el proyecto 1000 genomas (32), este último que contiene información de poblaciones latinoamericanas (MXL, mexicanos de Los Ángeles; PUR, puertorriqueños; PEL, peruanos de Lima; y CLM, colombianos de Medellín), será una referencia importante en la presente tesis doctoral.

Los SNPs se pueden clasificar dependiendo de la posición que ocupan en la secuencia del ADN; cuando el SNP se localiza dentro de una región codificante se clasifica como SNP intragénico, pero por otra parte, un SNP localizado en una región proximal a una región codificante se le conoce como SNP intergénico (24, 28, 33, 34). Los SNPs intergénicos se pueden clasificar a su vez de dos maneras como SNP sinónimo, donde el cambio de la base de ADN no produce un cambio en la secuencia

aminoacídica de la proteína codificada, y como SNP no sinónimo, donde el cambio de la base produce un cambio en la secuencia aminoacídica de la proteína codificada, lo que podría originar un cambio en la funcionalidad de dicha proteína (33, 34). Sin embargo, aunque la gran mayoría de SNPs se encuentran fuera de regiones codificantes, pueden afectar el fenotipo de un individuo. En algunos casos, esos SNPs alteran los niveles de expresión de las proteínas, por ejemplo si se localizan en regiones promotoras de los genes, alterando los niveles de expresión, lo que los hace clasificarse como eQTLs (Expression quantitative trait loci) (35). Según sus efectos, los eQTLs pueden ser clasificados como cis-eQTLs o trans-eQTLs. Los cis-eQTLs, como su nombre lo sugiere, son aquellos loci que se encuentran cerca al gen que afectan ($\leq 1\text{Mb}$), mientras que los trans-eQTLs son aquellos que se localizan lejos del gen que afectan ($\geq 5\text{Mb}$ de distancia o incluso en un cromosoma diferente) (35). A medida que aumenta el número de estudios en donde se resalta la importancia de los eQTLs, han aparecido varias iniciativas para generar un mapa de eQTLs en humanos (36-39). Dada la información creciente de estudios y de variantes no codificantes, pero cuyo efecto ha sido comprobado sobre el fenotipo de individuos específicos, se han creado herramientas bioinformáticas en línea que permiten analizar si los SNPs corresponden a eQTLs y/o variantes reguladoras, o si se encuentran en desequilibrio de ligamiento con una variante de este tipo. Entre dichas herramientas se pueden citar Blood eQTL browser (<http://genenetwork.nl/bloodeqtlbrowser/>) (39), RegulomeDB (<http://regulomedb.org/>) (40), HaploReg (<http://www.broadinstitute.org/mammals/haploreg/haploreg.php>) (41), LDlink (<http://analysistools.nci.nih.gov/LDlink/>) (42), entre otras.

Como se ha mencionado anteriormente los distintos marcadores genéticos son las herramientas principales de análisis para los estudios de asociación

genética. Un concepto que ha tomado importancia en los distintos estudios es el desequilibrio de ligamiento (LD). El LD en su forma más básica se define como la asociación no aleatoria de alelos ligados en un mismo loci (43). El genoma de un individuo presenta lo que se conoce como bloques de LD. Estos bloques son específicos de poblaciones y se ha visto que varían de acuerdo al origen étnico de los individuos (44). Los bloques de LD permiten hacer estudios de mapeo genético de forma más eficiente debido a que, utilizando unas pocas variantes, se puede inferir el resto de variantes que se encuentran en el mismo bloque, e igualmente pueden ayudar a localizar la causa o la variante causal de un fenotipo determinado a través del LD (45, 46).

Con el desarrollo y avance de las herramientas moleculares y bioinformáticas, para la caracterización de los marcadores en individuos de una población determinada, se han podido llevar a cabo estudios de asociación genética con distintas aproximaciones y metodologías. En la siguiente sección se explican brevemente los tipos de estudios genéticos de asociación, sus principales características y sus limitaciones en la práctica.

3.2.1.2 Tipos de estudio para la evaluación del riesgo genético

Debido a que el desarrollo de las enfermedades infecciosas no es igual en todos los individuos, el interés por estudiar los factores de riesgo genético que pueden influir tanto en contraer una infección como en la aparición de síntomas y/o gravedad de los mismos, ha llevado al desarrollo de distintas estrategias para la evaluación del riesgo (18, 22, 25).

Un primer diseño es el estudio de ligamiento genético, en donde los individuos con una característica particular de una familia son analizados. Este tipo de estudio cuenta con un alto potencial para detectar loci o marcadores genéticos asociados a la enfermedad o fenotipo. Sin embargo, este tipo de estudio tiene limitaciones operativas, ya que para el análisis de los marcadores genéticos de una enfermedad o fenotipo determinado, se requiere un gran número de familias numerosas, donde al menos una pareja de hermanos esté afectada por dicha enfermedad (18, 23, 25).

Otro diseño que es ampliamente utilizado es el estudio de casos y controles, en donde dos grupos de individuos, uno que presenta una enfermedad o fenotipo, es comparado con otro grupo de individuos control que carecen de dicha enfermedad o fenotipo analizado (25, 33, 34, 47). En términos generales, esta clase de estudios requieren de condiciones determinadas para otorgar mayor validez a los resultados. En primer lugar, tanto pacientes como controles deben pertenecer a una misma población o área geográfica; esta condición busca que los individuos de ambos grupos se vean expuestos a condiciones ambientales similares, buscando dar más peso a la posible influencia genética sobre el fenotipo analizado (48). La segunda condición que se requiere en estos estudios, es que los individuos deben ser miembros de una misma raza o tener un mismo origen étnico (48). Esta última condición busca que las diferencias genéticas halladas entre los grupos, casos y controles, se deban principalmente al origen genético funcional, que afecte directamente el fenotipo analizado y no a diferencias genéticas relacionadas a una estratificación poblacional que afecte las frecuencias alélicas de los marcadores, lo cual para el caso particular de la presente tesis doctoral, la población colombiana, plantea un reto adicional debido al alto grado de mestizaje (49-51).

Para llevar a cabo la comparación entre casos y controles, se evalúa la frecuencia de los distintos marcadores genéticos en ambos grupos, y se estima si existen diferencias estadísticamente significativas de las frecuencias de los marcadores genéticos entre los dos grupos de individuos. Para este diseño existen dos estrategias principales de estudio, la estrategia de genes candidatos (30, 52) y, los estudios de asociación de genoma completo o GWAS (Genome-wide association studies) (33, 34, 47, 48); dichas estrategias se describen a continuación:

Los análisis de genes candidatos son estudios en el que una o varias variantes genéticas, previamente seleccionadas con base en una hipótesis, son evaluadas frente a una enfermedad o un fenotipo determinado (52, 53). En el caso de las enfermedades infecciosas, se eligen genes relacionados con aspectos funcionales de la respuesta inmune/inflamatoria del hospedero frente al patógeno, donde una variante genética puede estar relacionada con una susceptibilidad diferencial a la enfermedad. Estos estudios han sido llevados a cabo en muchas enfermedades infecciosas tales como Chagas, malaria, leishmaniasis, tuberculosis, lepra y sida (18, 22, 23, 54, 55), sin embargo, presentan ciertas restricciones ya que en algunos casos el tamaño muestral utilizado, entre otras limitantes, han hecho que los resultados en muchos casos no sean replicables (25).

Por otro lado, en los últimos años se han presentado más estudios de genoma completo o GWAS en enfermedades tales como malaria, lepra, sida, hepatitis B, hepatitis C, dengue y Chagas (18, 22, 23, 25, 56, 57). Este tipo de estudios como su nombre lo indica, evalúan distintos marcadores genéticos a lo largo de todo el genoma de un individuo, razón por la cual no requieren de una hipótesis previa para su evaluación e incluso pueden generar nuevas hipótesis sobre la etiología de las enfermedades o fenotipos analizados. No obstante, el mayor obstáculo con

los estudios de genoma completo, es el elevado número de individuos (de hasta miles) que se requieren para ser analizados, lo que ha restringido su aplicación solo a ciertas enfermedades (48).

En los diferentes estudios genéticos llevados a cabo, varios genes han sido catalogados como potenciales elementos de riesgo de infección o de severidad en diversas enfermedades infecciosas. En la siguiente sección, se hará un repaso de los hallazgos más importantes que han permitido una mejor comprensión del efecto de los factores genéticos en diversas enfermedades infecciosas.

3.2.2 Estudio de los factores genéticos en enfermedades infecciosas

En los estudios de asociación en varias enfermedades, se han caracterizado marcadores genéticos de susceptibilidad bien definidos. Un primer ejemplo de esto, son los reportes que existen con la malaria, enfermedad tropical causada en humanos por cuatro especies del protozoo del género *Plasmodium* (*P. vivax*, *P. falciparum*, *P. ovale*, y *P. malariae*) (58, 59). El más común de las especies es *P. vivax*, que tiene mayor prevalencia en regiones endémicas de América Latina y Asia, mientras que la especie *P. falciparum* es más prevalente en las áreas endémicas de África (58). Esta diferencia en la prevalencia se determinó que es causada por una mutación en la región génica del alelo del receptor de quimiocinas Duffy (DARC). Dicha variante, localizada en la región promotora, ocasiona un cambio que genera un alelo nulo en individuos africanos los cuales carecen de esta proteína en sus glóbulos rojos (60). Debido a esto, *P. vivax* no puede infectar a estos individuos ya que para entrar en las

células sanguíneas necesita anclarse al receptor Duffy (61). En consecuencia, en poblaciones subsaharianas el parásito con mayor prevalencia es *P. falciparum*, cuyo cuadro de enfermedad es más severo, sobre todo en niños donde causa complicaciones severas como la malaria cerebral (58, 59). Otro gen que ha sido caracterizado como de susceptibilidad es el gen *HBB*, que codifica para la hemoglobina beta. Variaciones en este gen pueden causar enfermedades tales como anemia de células falciformes, en la cual los glóbulos rojos presentan una forma ovoide alargada y son inmunes a la infección por el *Plasmodium*, lo que le confiere protección a los individuos portadores de dicha mutación (62, 63).

Otra enfermedad donde una variante genética confiere un grado diferente de susceptibilidad, es en el síndrome de inmunodeficiencia adquirida (SIDA), el cual es consecuencia de la infección por el virus de la inmunodeficiencia humana (VIH). Un estudio demostró que una mutación en el gen del receptor de quimiocinas 5 (*CCR5*) en el que había una delección de 32 pares de bases (*CCR5* Δ 32) podía proteger a los individuos portadores de dicha mutación de la infección por el virus tipo 1 (VIH-1) y por ende de padecer SIDA, siendo aún menos susceptibles los individuos homocigotos para esta mutación. Similar al caso de la malaria, esto se debe a que para infectar las células hospederas, el virus necesita el reconocimiento de un receptor específico, en este caso, el del receptor de quimiocinas 5 (*CCR5*) (64).

De manera similar, otros genes han sido caracterizados en distintas enfermedades infecciosas. Un grupo de genes muy estudiados y que han sido identificados como de importancia en la susceptibilidad a infección y/o grado de severidad en enfermedades infecciosas, son los genes del complejo del antígeno leucocitario humano o HLA (Human leukocyte

antigen) (18, 22, 23, 53, 65). Estos genes están ubicados en el cromosoma 6 y comprenden una vasta región en los cuales se pueden encontrar los genes *HLA* de tipo I clásicos (*HLA-A*, *-B*, y *-C*), no clásicos (*HLA-E*, *-F* y *-G*) y *HLA* de tipo II (*HLA-DP*, *-DM*, *-DQ*, y *-DR*) (66). Estos genes involucrados en la respuesta inmune tienen una alta variabilidad debido a una elevada presión selectiva. En diversas enfermedades infecciosas se han descrito diferentes alelos de HLA que están implicados en la susceptibilidad y/o severidad de la enfermedad (65).

Gracias al creciente número de GWAS realizados en enfermedades infecciosas, diversos marcadores genéticos han sido hallados estadísticamente asociados con fenotipos de la enfermedad (18, 23). En la tabla 1, se hace un breve resumen de esto.

De acuerdo a todo lo expuesto anteriormente, existen datos sólidos que apoyan el papel de los factores genéticos de los individuos en la susceptibilidad y el desarrollo de los distintos fenotipos en las enfermedades infecciosas. En la presente tesis doctoral abordaremos específicamente la enfermedad de Chagas, una enfermedad infecciosa endémica de América Latina y cuya patogenia ha despertado gran interés, promoviendo la realización de este estudio.

Enfermedad	Fenotipo	Población	Genes Asociados
Sida (VIH-1)	Carga viral	Europea	<i>HLA-B, HLA-C, HCP5</i>
	Carga viral	Afro-americana	<i>HLA-B</i>
	Control de VIH-1	Europea	<i>HLA-B, HLA-C, HCP5, MICA</i>
	Control de VIH-1	Afro-americana	<i>HLA-B</i>
	Progreso de la enfermedad	Europea	<i>ZNRD1, RNF39</i>
	Progreso de la enfermedad	Europea / Americana	<i>PARD38</i>
	No progreso de la enfermedad a largo plazo	Europea	<i>HLA-B, HCP5, CXCR6</i>
Hepatitis C	Eliminación viral espontánea	Europea	<i>IL28B</i>
Hepatitis B	Infección crónica	Japonesa / Taiwanesa	<i>HLA-DPA1, HLA-DPB1</i>
Dengue	Síndrome de Shock	Vietnamita	<i>MICB, PLCE1</i>
Malaria severa	Susceptibilidad	Africana (Gambia)	<i>HBB</i>
Tuberculosis	Susceptibilidad	Africana (Gana, Gambia, Malauí)	<i>GATA6, CTAGE1, RBBP8, CABLES1</i>
Lepra	Susceptibilidad	China	<i>LACC1, NOD2, CCDC122, HLA-DQ/DP</i>
Meningococo	Protección	Europea	<i>CFH, CFHR3</i>

Tabla 1. Marcadores genéticos identificados en enfermedades infecciosas, agrupados de acuerdo a fenotipo y poblaciones analizadas. Modificada de (18, 23).

3.3. Genética de la enfermedad de Chagas: Estudios previos

Como se ha mencionado numerosas veces, del total de individuos infectados con *T. cruzi*, solo un 30% aproximadamente desarrollará una de las formas crónicas severas de la enfermedad de Chagas, es decir, cardiomiopatía Chagásica crónica y/o forma digestiva (3, 5). Esta variabilidad en el pronóstico de los individuos ha despertado el interés de los genetistas, ya que se cree que los factores genéticos del hospedador pueden estar involucrados en el grado de susceptibilidad a desarrollar una de las formas crónicas severas de dicha enfermedad (54, 55). Un estudio realizado en Brasil describió que ciertas características fenotípicas de la enfermedad se presentaban de forma diferenciada en unidades o clanes familiares dentro de una misma área endémica. Al realizarse un análisis detallado, se logró establecer que la heredabilidad de características tales como seropositividad y complicaciones en fase crónica de la enfermedad era de 0,56, lo que indicaba en este caso en particular, que el fenotipo de los individuos depende hasta un 56% del componente genético de los mismos (67).

En Colombia, al igual que en la mayoría de países del área endémica, la forma crónica sintomática más prevalente en los pacientes es la cardiomiopatía Chagásica crónica (3, 5). Durante los últimos años, diferentes estudios de susceptibilidad genética han sido llevados a cabo con individuos colombianos, siendo el diseño de la mayoría de estos estudios del tipo caso/control de genes candidatos. Los grupos comparados corresponden principalmente a la siguiente clasificación: 1) Individuos seronegativos a *T. cruzi* vs. pacientes seropositivos, donde se evalúa el riesgo de infección por el parásito, y 2) Pacientes seropositivos

asintomáticos vs pacientes seropositivos sintomáticos, donde se evalúa el riesgo de desarrollo de las formas crónicas graves de la enfermedad, principalmente cardiomiopatía Chagásica crónica (54, 55, 68).

Debido a que el perfil inmunológico de los pacientes muestra una relación entre un ambiente pro-inflamatorio asociado a presencia de síntomas en la fase crónica de la enfermedad (2, 10, 11), la gran mayoría de estudios inmunogenéticos se ha enfocado en los genes que codifican citoquinas y otro tipo de proteínas involucrados en respuesta inmune/inflamatoria. Adicionalmente, también existen estudios realizados en los genes HLA (54) encontrando alelos y haplotipos de susceptibilidad. En los últimos años también se realizó un primer estudio en genes *KIR* (Killer Cell Immunoglobulins like receptors) (69), una familia de genes altamente polimórficos y que cada vez despierta un mayor interés debido a la importancia que se ha visto en distintos tipos de enfermedades.

Entre los genes estudiados en población endémica colombiana se encuentran distintos loci que codifican para citoquinas pro-inflamatorias. Tal es el caso del clúster de IL-1, una citoquina involucrada en respuesta inmune innata. Para llevar a cabo este análisis, se utilizaron las frecuencias alélicas y genotípicas de polimorfismos del *IL1A*, *IL1B* y *IL1RN*, encontrando que *IL1B* parecía influir en el riesgo de desarrollo de cardiomiopatía (70). Otro gen analizado fue *IL12B*, el cual codifica para la citoquina IL-12B, involucrada en la diferenciación de células de tipo Th1, hallando un resultado similar al que se obtuvo con *IL1B* (71). Además de éstos, se han examinado otros genes tales como *TNFA* e *IFNG*, cuyos productos TNF- α e IFN- γ son cruciales en la respuesta inmune en enfermedad de Chagas, observando que el gen *TNFA* jugaba un papel importante en el riesgo de desarrollo de síntomas crónicos severos,

mientras que por el lado de *IFNG*, se notó que este gen confería un riesgo diferencial a la infección por *T. cruzi* (72, 73).

Por otra parte, otros genes analizados son aquellos involucrados en la producción de citoquinas anti-inflamatorias o reguladoras. Entre esos se encuentran los de *IL4*, *IL4RA*, *IL10* y *TGFBI*, para los que se observó que *IL4RA* estaba asociado a riesgo de desarrollo de cardiomiopatía crónica Chagásica mientras que *TGFBI* estaba asociado a riesgo de infección (74, 75).

Otros genes en los que se ha indagado su papel en el riesgo de infección y/o desarrollo de cardiomiopatía son aquellos de receptores de quimiocinas *CCR2* y *CCR5*, involucrados en el tráfico de linfocitos T, macrófagos y monocitos, los cuales se ha visto que están involucrados en patogénesis de enfermedades cardiovasculares, encontrando que estos genes estaban asociados con la aparición de cardiomiopatía en los individuos del estudio (76, 77). De manera similar, otro gen examinado fue el gen *MIF*, gen que participa en la respuesta inmune inflamatoria y que codifica para una proteína producida por células T activadas y parece estar relacionada con enfermedades crónicas inflamatorias, descubriendo en este caso que el gen estaba asociado a riesgo de infección (78).

En la tabla 2 se resumen los hallazgos importantes de asociación de genes candidatos en susceptibilidad de infección y/o desarrollo de cardiomiopatía crónica Chagásica en población colombiana.

Gen Analizado	Número de Individuos	Característica Asociada
<i>IL1B</i>	130 CCC / 130 Asintomáticos	Riesgo de desarrollo de CCC
<i>IL12B</i>	200 Seronegativos / 260 Seropositivos	Riesgo de desarrollo de CCC
<i>IL4RA</i>	130 CCC / 130 Asintomáticos	Riesgo de desarrollo de CCC
<i>TNFA</i>	159 CCC / 154 Asintomáticos	Riesgo de desarrollo de CCC
<i>CCR2, CCR5</i>	270 CCC / 206 Asintomáticos	Severidad de CCC
<i>TGFB1</i>	187 Seronegativos / 275 Seropositivos	Riesgo de Infección
	143 CCC / 132 Asintomáticos	
<i>MIF</i>	199 Seronegativos / 240 Seropositivos	Riesgo de Infección
	125 CCC / 115 Asintomáticos	
<i>IFNG</i>	282 Seronegativos / 236 Seropositivos	Riesgo de Infección
	120 CCC / 116 Asintomáticos	

Tabla 2. Genes asociados a infección y/o formas crónicas sintomáticas en población colombiana (70-78). CCC: cardiomiopatía Chagásica crónica.

Otras variantes han sido estudiadas en población colombiana con las cuales no se ha encontrado una asociación a riesgo de infección o desarrollo de cardiomiopatía crónica Chagásica. Entre los genes examinados se encuentran *PTPN22*, *TLR2*, *TLR4*, *IL4* e *IL10* (74, 79, 80).

Es importante subrayar que estudios de asociación, donde se evalúa el riesgo de infección por *T. cruzi* y/o desarrollo de síntomas crónicos severos tales como cardiomiopatía crónica Chagásica o forma digestiva, se han realizado en distintos países del área endémica, principalmente en Brasil. Dichos estudios al igual que los realizados en población colombiana, son de tipo gen candidato, encontrándose varias asociaciones estadísticamente significativas con riesgo de infección y/o formas severas de la enfermedad (54, 55, 68, 69, 81-92). En la tabla 3 se detalla los hallazgos, donde se destacan genes tales como *TNFA*, *TGB1*, *IL1B* y *CCR5* que previamente han sido también analizados en población colombiana, como se detalló anteriormente en la tabla 2.

País de Estudio	Característica asociada	Genes asociados
Argentina	Infección / CCC	<i>HLA-DRB1</i>
Brasil	Formas clínicas	<i>HLA-A, HLA-DQB1, HLA-DR2</i>
Brasil	Infección	<i>TNFA</i>
Brasil	CCC / FD	<i>TNFA, TNFB</i>
Brasil	CCC	<i>LTA, BAT1, MCP1, IL10, IL18, CTLA4, MBL2</i> <i>KIRD2S2⁺/2DL2⁻/HLA-C1⁺</i>
Bolivia	Infección / FD	<i>HLA-B, HLA-DRB1</i>
Chile	CCC	<i>HLA-B</i>
Guatemala	CCC	<i>HLA-B</i>
México	Infección / CCC	<i>HLA-A, HLA-B, HLA-DR</i> <i>TNFA, IL1B, IL1RN</i>
Perú	Infección	<i>HLA-DRB1, HLA-DQB1</i> <i>IL6</i>
	CCC	<i>CCR5, TGFB1</i>
Venezuela	CCC	<i>HLA-C, HLA-DRB1, HLA-DQB1, HLA-DP1</i> <i>CCR5</i>

Tabla 3. Genes asociados a infección y/o formas crónicas sintomáticas en distintas poblaciones endémicas (54, 55, 68, 69, 81-92); CCC, cardiomiopatía Chagásica crónica; FD, forma digestiva.

Hasta el momento de la presente tesis doctoral, solo un estudio tipo GWAS ha sido llevado a cabo en enfermedad de Chagas (56). Este estudio analizó una cohorte de 499 pacientes infectados con el parásito que presentaban diferentes grados de sintomatología, sin embargo, por las limitaciones del tamaño muestral, no se encontraron asociaciones estadísticamente significativas a nivel genómico, lo cual evidencia que todavía falta mucho por hacer en el campo de la asociación genética de la enfermedad de Chagas.

En el presente trabajo se busca seguir expandiendo el conocimiento de bases genéticas de la enfermedad de Chagas estudiando genes de interleuquinas involucrados en vías inflamatorias así como genes reguladores de este tipo de respuesta.

De acuerdo a lo anterior, la estrategia de este estudio será la de analizar genes candidatos, en donde con base en estudios funcionales previos o hallazgos genéticos en otros estudios, tanto de enfermedades infecciosas como desórdenes inflamatorios autoinmunes, fueron elegidos un grupo de genes para ser analizados. A continuación se describen los genes escogidos y los motivos para su elección.

3.4. Genes analizados en el presente estudio

Los genes seleccionados para el presente estudio son genes de interleuquinas pro-inflamatorias y genes reguladores de respuesta inmune inflamatoria, por lo cual serán agrupados de acuerdo a estas características.

3.4.1 Genes de interleuquinas inflamatorias: *IL17A* e *IL18*

3.4.1.1 *IL17A*

El gen *IL17A*, localizado en el cromosoma 6, codifica la citoquina IL-17A, la cual está involucrada en la respuesta inmune inflamatoria. Esta interleuquina induce la producción de distintas citoquinas pro-inflamatorias entre las que podemos subrayar TNF- α , IL-1, IL-6, factor estimulante de colonia de granulocitos (G-CSF) y el factor estimulante de colonia de granulocitos y macrófagos (GM-CSF), y quimiocinas tales como CXCL1, CXCL5, IL-8, CCL2 y CCL7. Además, induce la proliferación de linfocitos T y la producción de anticuerpos por parte de linfocitos B (93). La IL-17A es producida por distintos tipos celulares, entre los que se destacan células Th17, células T $\gamma\delta$, células NK, neutrófilos, entre otros. Debido a que es producida por tipos celulares presentes en respuesta inmune innata y adaptativa, la IL-17A es considerada como un puente entre ambos tipos de respuesta inmune (94).

Diferentes estudios han evaluado la implicación de IL-17A en distintas enfermedades infecciosas (95). Para tal fin, se han hecho estudios con pacientes y modelos animales donde se ha analizado leishmaniasis, malaria y también enfermedad de Chagas. De acuerdo a los resultados

presentados en esos estudios, es claro el papel determinante de la IL-17A en la inmunidad a distintos patógenos. Por ejemplo, los niveles de IL-17 en sueros de individuos infectados con *Leishmania donovani* estaban directamente relacionados con la aparición de síntomas severos como Kala Azar; los sujetos que no desarrollaban las formas graves de la enfermedad presentaban niveles más elevados de IL-17 cuando se les comparaba con individuos con Kala Azar (96). En *Leishmania infantum*, ratones knockout para el receptor de IL-17A mostraron niveles incrementados de parasitemia en sangre comparados con ratones silvestres, además de niveles incrementados de citoquinas anti-inflamatorias, sugiriendo que IL-17A favorece la eliminación del parásito apagando la respuesta anti-inflamatoria y potenciando un ambiente inflamatorio (97). Para el caso de malaria, un estudio realizado con modelos murinos mostró que IL-17A jugaba un papel fundamental en la eliminación parasitaria; ratones knockout para IL-17A presentaban niveles incrementados de parasitemia y una tasa de mortalidad más elevada comparada con los ratones silvestres (98).

En enfermedad de Chagas, el papel de IL-17A ha sido analizado tanto en modelos experimentales como en pacientes infectados con *T. cruzi*. Por un lado, IL-17A modula la respuesta inmune controlando la producción de IFN- γ y TNF- α , reduciendo el daño en tejido cardíaco (99). Por otro lado, y de manera similar a las enfermedades mencionadas anteriormente, ratones knockout mostraban una parasitemia y mortalidad aumentada (100). Finalmente, un trabajo realizado con pacientes mostró que los individuos con niveles bajos de IL-17A presentaban una mayor frecuencia de cardiomiopatía crónica Chagásica (101).

De acuerdo a la evidencia científica que existe, es posible que los niveles de expresión de IL-17A puedan intervenir en la susceptibilidad a la

enfermedad de Chagas. Es por esto que en esta tesis nos planteamos estudiar si polimorfismos localizados en el gen *IL17A* pueden influir en la infección y/o gravedad de la enfermedad.

3.4.1.2 *IL18*

El gen *IL18* codifica para la IL-18, una interleuquina de la familia de citoquinas tipo Th1 junto con IL-2, IL-12 e IL-15 (102). Esta citoquina pro-inflamatoria induce la producción de IFN- γ y ha sido descrita como esencial para el control de patógenos intracelulares (103, 104). IL-18 es producida por un amplio rango de células, en las que se encuentran células de Kupffer, macrófagos, linfocitos T y linfocitos B, entre otras (105).

Similar al caso de IL-17A, la IL-18 ha sido ampliamente estudiada en distintas enfermedades infecciosas. En leishmaniasis, estudios en modelos animales infectados con *L. donovani* han mostrado que la IL-18 aumenta la producción de IFN- γ en células NK, ayudando a la eliminación del parásito potenciando la respuesta tipo Th1 (106). Pero, por otra parte, en malaria los niveles de IL-18 elevados parecían afectar el grado de severidad de la enfermedad en pacientes, llegando a presentarse fenotipos tales como anemia asociada a malaria cerebral (107).

Variantes del gen *IL18* habían sido analizadas en grupos de pacientes con enfermedades infecciosas tales como malaria (107), leishmaniasis (108), e infecciones virales tales como virus de hepatitis B (109, 110) y virus de hepatitis C (111, 112). En el caso particular de la enfermedad de Chagas, un estudio realizado en una cohorte Brasileña de pacientes mostró que el polimorfismo rs2043055 parecía estar involucrado en el riesgo de desarrollo de cardiomiopatía crónica Chagásica en los pacientes analizados (90).

Con base en esto, para la presente tesis doctoral se ha decidido hacer una evaluación exhaustiva de polimorfismos de gen de *IL18*, con el fin de confirmar si las variantes del gen de la IL-18 pueden jugar un importante papel en la susceptibilidad de los individuos a la enfermedad de Chagas.

3.4.2 Genes relacionados con la regulación de la respuesta inmune-inflamatoria: *FOXO3*, *VDR* y *TYK2*

3.4.2.1 *FOXO3*

El factor de transcripción FOXO3 es una proteína codificada por el gen *FOXO3*, localizada en el cromosoma 6. Este factor es un elemento de control de la respuesta inmune, regulando la acción de células dendríticas, linfocitos T y macrófagos (113).

En un estudio previo se observó que una variante genética, rs12212067, localizada en una zona intrónica del gen *FOXO3*, parece intervenir en el grado de severidad de dos enfermedades autoinmunes; artritis reumatoide y enfermedad de Crohn (114, 115), y de forma interesante en enfermedades infecciosas tales como malaria y tuberculosis (114, 116, 117). Este polimorfismo parece estar relacionado con niveles diferenciales de expresión de FOXO3; en modelos experimentales el alelo minoritario G ha mostrado mayores niveles de expresión, lo que desencadena reducción en los niveles de citoquinas pro-inflamatorias tales como IFN- γ y TNF- α (114).

Teniendo en cuenta la importancia que tienen tanto IFN- γ como TNF- α en la respuesta inmune en contra de *T. cruzi* en los individuos infectados, decidimos analizar la variante mencionada en esta tesis doctoral.

3.4.2.2 VDR

La vitamina D es un modulador de la respuesta inmune (118, 119). Este compuesto actúa sobre distintas células de la respuesta inmune tanto innata como adaptativa (120). La forma activa de este compuesto aumenta la fagocitosis por parte de los macrófagos e induce la producción de péptidos antimicrobianos (118, 121). Además, modula la respuesta inmune adaptativa induciendo una respuesta de tipo Th2, inhibiendo la producción de citoquinas tales como IFN- γ , IL-12, IL-17 e IL-21 entre otras (119).

Para que la vitamina D ejerza su función sobre las células, este compuesto debe unirse al receptor de vitamina D (VDR), el cual está presente en sus superficies (120). Este receptor es codificado por el gen *VDR*, localizado en el cromosoma 12. Debido a su importancia, las variantes polimórficas de este gen han sido ampliamente estudiadas en el contexto de diversas enfermedades, autoinmunes e infecciosas (119, 122). Una enfermedad infecciosa que ha sido profundamente analizada es la tuberculosis, hallándose en diferentes estudios que esas variantes pueden intervenir directamente sobre el pronóstico de la misma en las distintas poblaciones estudiadas (121, 122).

Dado el papel regulatorio de vitamina D en la respuesta inmune inflamatoria, así como su rol en la respuesta inmune de tipo innato, y que esta respuesta inflamatoria es esencial para el control del parásito, se ha

incluido en el presente trabajo el análisis de polimorfismos del gen de *VDR* en la población de estudio.

3.4.2.3 *TYK2*

TYK2 es una quinasa miembro de la familia de quinasas Janus (JAK), implicadas en la transducción de señales de interferones de tipo I y varios tipos de citoquinas, entre las que se encuentra a IL-6, IL-10, IL-12 e IL-13 (123). Esta quinasa es codificada por el gen *TYK2*, localizado en el cromosoma 19. Modelos experimentales, así como estudios en pacientes que presentan mutaciones en el gen *TYK2*, han demostrado la importancia de esta quinasa en la respuesta inmune, ya que ratones knockout así como los individuos previamente mencionados presentan alteraciones a nivel inmune, una susceptibilidad incrementada a diferentes tipos de infecciones y un balance alterado de las respuestas Th1/Th2 (124-128).

Recientemente, se observó que varios polimorfismos localizados en este gen están asociados con desórdenes inflamatorios autoinmunes (artritis reumatoide, lupus eritematoso sistémico y esclerosis sistémica) (129, 130). Estos SNPs según herramientas bioinformáticas (131, 132), parecen tener una implicación funcional, por lo que pueden influir significativamente en la intensidad de la respuesta inmune inflamatoria.

De acuerdo a esta premisa, es interesante analizar estos polimorfismos en esta tesis doctoral y observar si éstos pueden estar asociados a infección o aparición de síntomas crónicos graves en los individuos estudiados.

可
可
可
可
可
可
可
可
可
可
可
可

4. Hipótesis y justificación

En la actualidad se estima que alrededor de 120 millones de personas viven en zonas endémicas para la enfermedad de Chagas, y se calcula que más de 6 millones de individuos se encuentran actualmente infectados por *T. cruzi* (4). De estas personas, no se sabe con exactitud cuántos individuos desarrollarán formas crónicas severas tales como la cardiomiopatía Chagásica crónica, lo que directamente afectará su calidad y pronóstico de vida. Debido a la dificultad de un diagnóstico temprano y la eficacia relativa de los medicamentos utilizados para el tratamiento de la enfermedad (3), es necesario generar nuevas herramientas de pronóstico que permitan una correcta identificación de los individuos y/o pacientes susceptibles que vivan en zonas endémicas.

La hipótesis del presente estudio se basa en que el perfil genético de los pacientes está directamente relacionado con la susceptibilidad a la infección con *T. cruzi* y/o el desarrollo de la cardiomiopatía Chagásica crónica.

Con los resultados obtenidos en esta tesis doctoral, se podrá no solo avanzar en el entendimiento de las bases genéticas de la enfermedad, sino en posibles propuestas para el futuro desarrollo de biomarcadores que permitan un mejor pronóstico a padecer las formas severas de la enfermedad de Chagas, así como permitir la identificación de nuevas dianas terapéuticas.

可
可
可
可
可
可
可
可
可
可

5. Objetivos

5.1. Objetivo General

Determinar la asociación de variantes alélicas de genes de respuesta inmune/inflamatoria con la susceptibilidad a la infección con *T. cruzi* y avance de cardiomiopatía en pacientes con enfermedad de Chagas mediante un estudio de tipo caso/control de genes candidatos.

5.2. Objetivos específicos

5.2.1 Determinar mediante un estudio de genes candidatos la asociación de variantes alélicas de los genes *IL17A*, *IL18*, *FOXO3*, *VDR* y *TYK2* con la susceptibilidad a infección con *T. cruzi*.

5.2.2 Determinar mediante un estudio de genes candidatos la asociación de variantes alélicas de los genes *IL17A*, *IL18*, *FOXO3*, *VDR* y *TYK2* con la severidad y avance de la cardiomiopatía crónica Chagásica causada por *T. cruzi*.

5.2.3 Realizar un primer análisis de interacción entre los genes reportados como marcadores de riesgo de infección y/o severidad de enfermedad de Chagas en población colombiana mediante el uso de herramientas bioinformáticas.

可
可
可
可
可
可
可
可
可
可

6. Diseño experimental

6.1. Selección de individuos y clasificación

Para el presente trabajo los individuos fueron reclutados mediante dos procesos diferentes, el primero de ellos fue a través de la Fundación Cardiovascular de Colombia, una institución médica especializada en cardiología localizada en la ciudad de Floridablanca, Santander, Colombia. Allí los pacientes diagnosticados por alteraciones cardiacas relacionadas con la enfermedad de Chagas fueron invitados a participar. El segundo proceso de reclutamiento de individuos fue a través de visitas al área endémica de la provincias de Comunera y Guanentina, localizadas también en el departamento de Santander (**Figura 5**). Allí la gente fue invitada a participar en el estudio.



Figura 5. Mapa de Colombia en donde se detalla: En gris, el Departamento de Santander; en rojo, las provincias de Guanentina y Comunera; la X, la localización de la ciudad de Floridablanca

De estos procesos, 1.171 individuos fueron seleccionados. Los habitantes de esta región de Colombia no pertenecen a ningún grupo étnico en particular y son considerados una mezcla homogénea (mestizos). Todos los individuos que aceptaron participar en el estudio, firmaron un consentimiento informado. Después de esto, fueron sometidos a pruebas serológicas de ELISA y hemaglutinación indirecta utilizando kits comerciales para enfermedad de Chagas (BioELISA Chagas y Chagatest IHA respectivamente). De acuerdo a los resultados, fueron clasificados en

seronegativos para antígenos de *T. cruzi* (n = 595), cuando daban negativos en ambas pruebas y seropositivos para antígenos de *T. cruzi* (n = 576), cuando daban positivos en al menos una de las pruebas serológicas. Los individuos seronegativos se usaron como grupo control para infección. Posteriormente, a los individuos seropositivos se les realizó examen clínico y cardiológico con la realización de electrocardiogramas y ecocardiogramas para definir la fase de la enfermedad. Basado en los resultados obtenidos, los pacientes que presentaron alguna anomalía fueron clasificados como pacientes sintomáticos o CCC (n = 401) e individuos asintomáticos (n = 175), siendo los miembros de este último grupo usados como grupo control para el análisis de riesgo de desarrollo de cardiomiopatía. Finalmente, los pacientes sintomáticos o CCC fueron catalogados según el grado de avance de la cardiomiopatía, siendo esta última clasificación de la siguiente manera: CII (n = 166, radiología indicativa de alteración hipertrófica leve del corazón o alteraciones menores según el electrocardiograma), CIII (n = 200, hipertrofia cardiaca moderada y alteraciones considerables en el electrocardiograma) y CIV (n = 35, cardiomegalia severa y alteraciones marcadas según el electrocardiograma). Esta clasificación se hizo siguiendo las guías de la OMS, la OPS y el consenso internacional de Buenos Aires de 2011 (<http://www.fac.org.ar/7cvc/llave/c016/mordinio.pdf>). Los individuos participantes en este estudio eran mayores de edad (≥ 18 años). La edad media de los participantes fue 45.68 años para los individuos seronegativos, 58.00 años para los individuos seropositivos asintomáticos y 63.14 años para los pacientes seropositivos sintomáticos o CCC. La distribución de género fue 55% femenino y 45% masculino.

6.2. Extracción de ADN y genotipado de polimorfismos de los genes candidatos

6.2.1 Extracción de ADN

A los individuos participantes se les tomó una muestra de sangre (~7 mL) y se extrajo el ADN según la técnica “salting out” descrita en (133).

6.2.2 Selección de polimorfismos a analizar

Los polimorfismos analizados en la presente tesis doctoral fueron seleccionados por distintas metodologías de acuerdo a cada gen, a continuación se explicará brevemente el proceso:

6.2.2.1 *IL17A*

Para el análisis del gen de *IL17A*, cinco polimorfismos fueron seleccionados mediante la técnica de tag-SNP (134), implementada por el software Haploview V4.1 (135). Para llevar a cabo este procedimiento, se tomó la región de *IL17A* utilizando la población CLM del proyecto 1000 genomas (32) y se usaron parámetros como $r^2 > 0.8$ y frecuencia de alelo minoritario (MAF) > 0.1 . Los SNPs analizados fueron rs4711998, rs8193036, rs3819024, rs22275913 y rs7747909 (**Figura 6**).

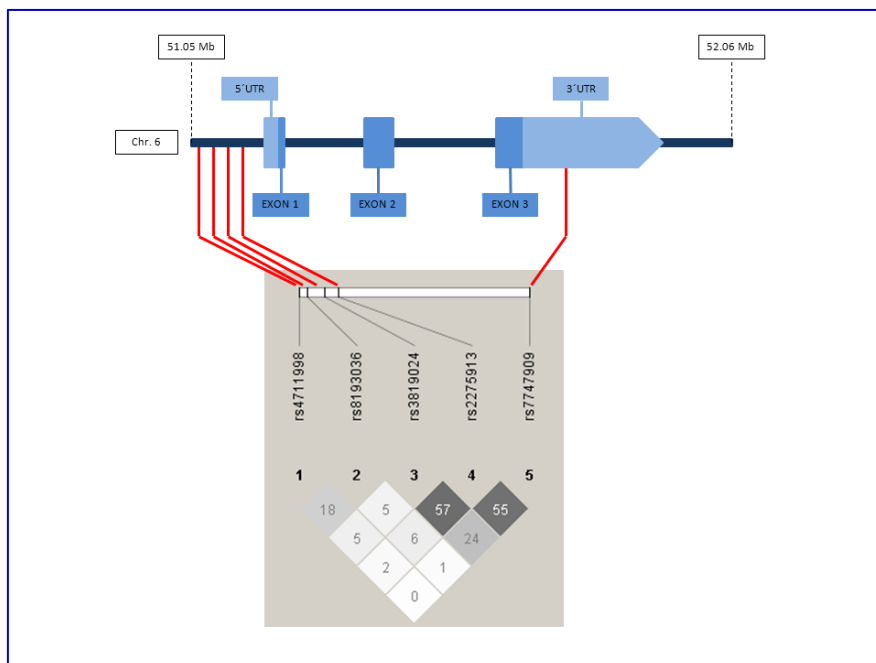


Figura 6. Mapa esquemático del gen de *IL17A* y localización aproximada los polimorfismos analizados. ■ indica regiones no traducidas; ■ indica exones; ▶ indica que este gen se encuentra sobre la hebra líder. En la parte inferior se muestra el LD de los polimorfismos en la población de estudio, indicando el valor de r^2 .

6.2.2.2 *IL18*

Para el estudio del gen de *IL18*, seis polimorfismos fueron seleccionados, cuatro a partir de reportes previos de funcionalidad y dos mediante tag-SNP: Las variantes rs187238 y rs1946518 están localizadas en la región promotora del gen y estudios previos muestran que alteran los niveles de expresión (136-139); el polimorfismo rs2043055 está localizado en una región intrónica y un estudio previo mostró que estaba asociado a avance de cardiomiopatía Chagásica crónica en una cohorte brasileña (90); el SNP rs360719 que interactúa con un factor de transcripción (140); y finalmente dos variantes adicionales, rs5744258 y rs360722, elegidas por

tag-SNP para cubrir la parte faltante del gen, utilizando población CLM y parámetros $r^2 > 0.8$ y $MAF > 0.1$ (**Figura 7**).

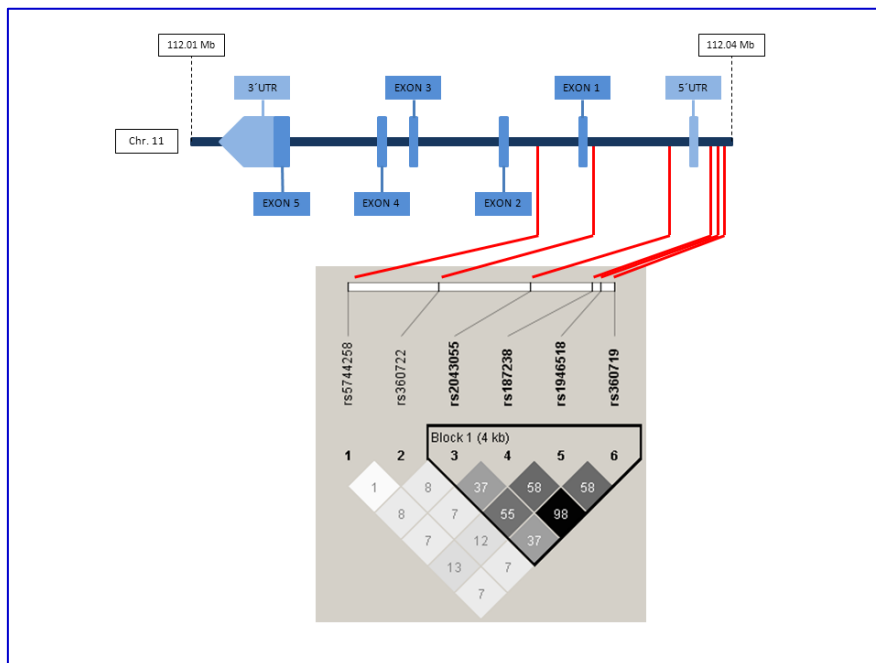


Figura 7. Mapa esquemático del gen de *IL18* y localización aproximada de los polimorfismos analizados. ■ indica regiones no traducidas; ■ indica exones; ◀ indica que este gen se encuentra sobre la hebra complementaria. En la parte inferior se muestra el LD de los polimorfismos en la población de estudio, indicando el valor de r^2 .

6.2.2.3 *FOXO3*

Para el análisis de este gen, solo se genotipó el polimorfismo rs12212067 que había sido previamente analizado y que alteraba los niveles de expresión de *FOXO3*, alterando el control de la expresión de citoquinas pro-inflamatorias (114) (**Figura 8**).

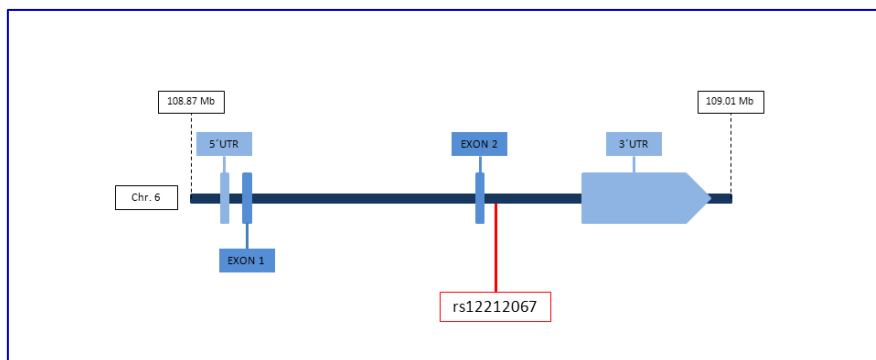


Figura 8. Mapa esquemático del gen de *FOXO3* y localización aproximada del polimorfismo analizado. ■ indica regiones no traducidas; ■ indica exones; ▶ indica que este gen se encuentra sobre la hebra líder.

6.2.2.4 *VDR*

Para analizar el gen *VDR*, cuatro polimorfismos fueron seleccionados con base en su implicación funcional analizada en estudios previos. Los SNPs rs731236, rs7975232 y rs1544410 alteran los niveles de expresión de ARN mensajero y la variante rs2228570 da origen a una proteína más larga cuya actividad transcripcional se ve reducida (141-144) (**Figura 9**).

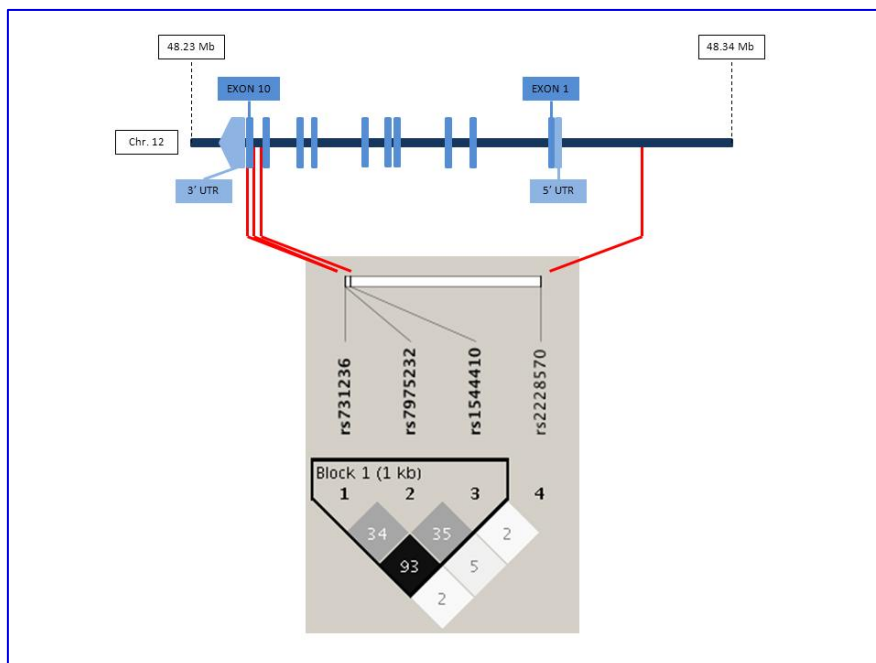


Figura 9. Mapa esquemático del gen de *VDR* y localización aproximada de los polimorfismos analizados. ■ indica regiones no traducidas; ■ indica exones; ◀ indica que este gen se encuentra sobre la hebra complementaria. En la parte inferior se muestra el LD de los polimorfismos en la población de estudio, indicando el valor de r^2 .

6.2.2.5 *TYK2*

Para estudiar el gen *TYK2*, tres polimorfismos fueron seleccionados. Las variantes fueron rs34536443, rs12720356 y rs2304256. Los tres polimorfismos corresponden a cambios no sinónimos que producen alteraciones en la secuencia de la proteína alterando su funcionalidad. Además, estas variantes influyeron en desórdenes autoinmunes tales como artritis reumatoide, lupus y esclerosis sistémica (129, 130) (**Figura 10**).

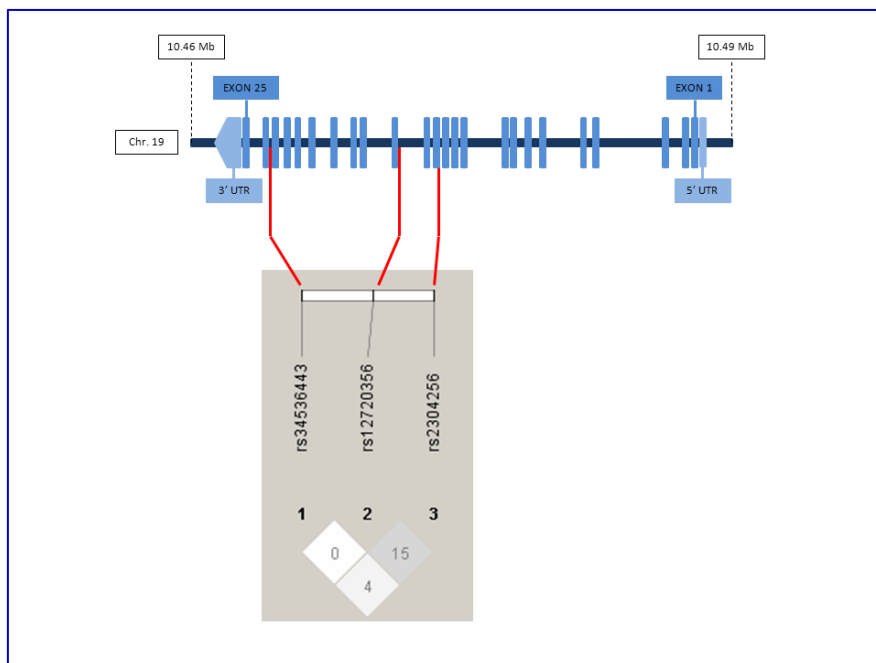


Figura 10. Mapa esquemático del gen de *TYK2* y localización aproximada de los polimorfismos analizados. ■ indica regiones no traducidas; ■ indica exones; ◀ indica que este gen se encuentra sobre la hebra complementaria. En la parte inferior se muestra el LD de los polimorfismos en la población de estudio, indicando el valor de r^2 .

6.2.3 Genotipado de muestras

Los polimorfismos de los distintos genes fueron genotipados mediante la técnica de discriminación alélica con sondas TaqMan. Las sondas eran prediseñadas y compradas por catálogo de Applied Biosystems®. Esta metodología se basa en la técnica de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) en tiempo real. A diferencia de una PCR convencional, en donde dos cebadores amplifican una región de ADN de interés, este tipo de PCR utiliza adicionalmente una sonda u otro tipo de marcador que indica de manera cuantitativa y en tiempo real un evento de amplificación de ADN. En el caso particular de la discriminación alélica, dos sondas con dos fluorocromos diferentes, conocidos como reporteros (VIC y FAM en

la mayoría de los casos), son utilizadas (145). Además, las sondas contienen un elemento apagador o “quencher” que permite mantener controlados los niveles de fluorescencia antes de que la sonda se una a la secuencia diana. Cada sonda contiene un alelo específico del polimorfismo estudiado, que al unirse a la secuencia blanco, libera una reacción de luminiscencia, indicando la presencia de un alelo en particular en la muestra examinada (145) (**Figura 11**). Dependiendo de las señales emitidas, se puede determinar si un individuo es homocigoto para un alelo o para el otro alelo, o si se trata de un individuo heterocigoto para el polimorfismo analizado (145).

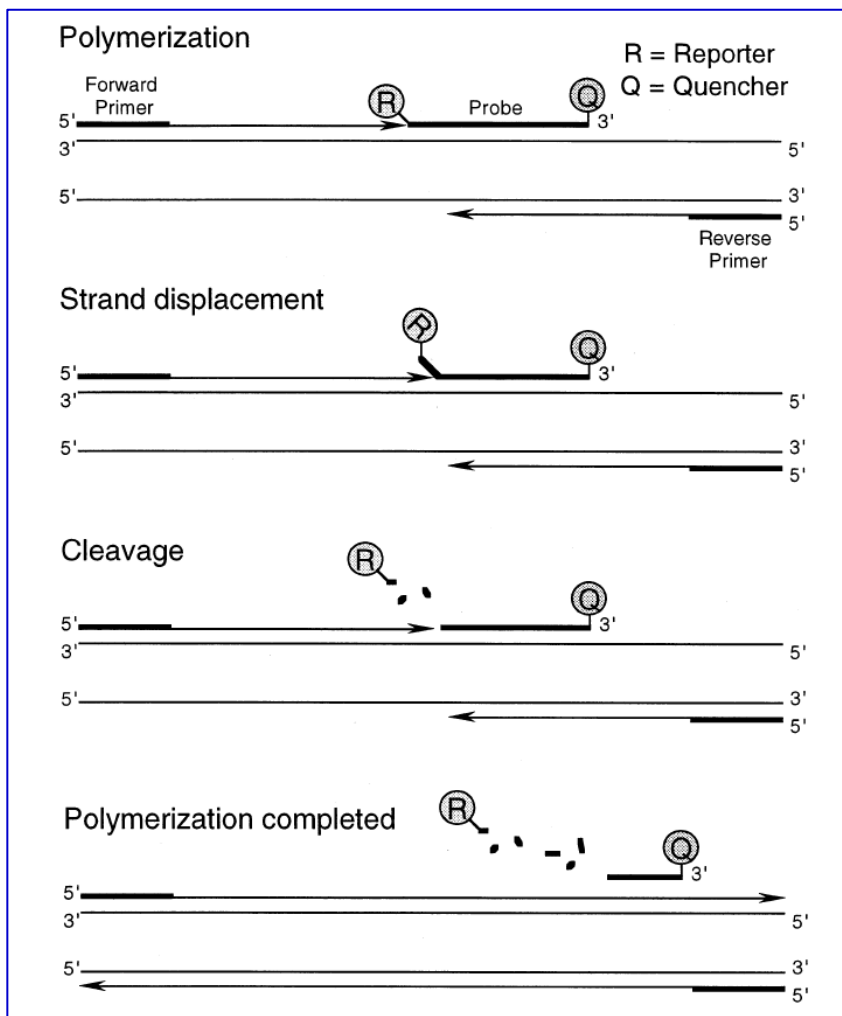


Figura 11. Funcionamiento básico de las sondas TaqMan. Cuando la sonda se une a la secuencia diana, la polimerasa utilizada en la reacción rompe la sonda por medio de la actividad exonucleasa 5'-3', separando el fluorocromo del apagador generando la luminiscencia. Tomado de (145).

6.3. Análisis estadístico

Para análisis estadístico de los resultados se utilizó el software estadístico PLINK V1.07 (146). En todos los casos, para todos los SNPs se evaluó que se encontraran en equilibrio de Hardy-Weinberg con un nivel de significancia al 1%. Adicionalmente, los datos de los individuos que no alcanzaran una tasa de genotipado exitoso del 50% fueron filtrados del estudio. Por otra parte, el umbral de genotipado exitoso por cada variante alélica analizada en el estudio fue establecido en el 95%. El desequilibrio de ligamiento de las variantes genéticas de los genes y la estimación de haplotipos en los individuos fueron calculados con el software Haploview V4.1 (135). El poder estadístico de los diferentes análisis fue calculado por medio del software estadístico CaTS (147), teniendo como referencia la prevalencia de Chagas (1.44% según datos del Instituto nacional de salud de Colombia) (<http://www.ins.gov.co/temas-de-interes/Paginas/chagas.aspx>) y un rango de ORs comprendido entre 1.10 y 1.50.

Para establecer la asociación de los genes con riesgo de infección, se compararon las frecuencias alélicas, fenotípicas y haplotípicas (Esta última solo en el caso de *IL18* y *VDR*) de los distintos polimorfismos de los individuos seronegativos con las frecuencias de los individuos seropositivos. Para evaluar el riesgo de desarrollo de síntomas severos, se compararon las frecuencias alélicas, genotípicas y haplotípicas (*IL18* y *VDR*) de los individuos asintomáticos con los pacientes con cardiomiopatía crónica chagásica. Estas comparaciones se llevaron a cabo con el test de χ^2 o regresión logística, usando para esta última prueba el dato de edad como covariable en caso de ser necesario. Para todos los

análisis, excepto por *FOXO3*, se hizo corrección por la prueba de tasas de falso descubrimiento (FDR) de Benjamini & Hochberg.



可
可
可
可
可
可
可
可

7. Publicaciones



7.1. Investigation of the role of *IL17A* gene variants in Chagas disease





ORIGINAL ARTICLE

Investigation of the role of *IL17A* gene variants in Chagas disease

DA Leon Rodríguez¹, LE Echeverría², CI González^{3,4} and J Martín^{1,4}

Human host genetic factors have been suggested to be determinants of the prevalence and clinical forms of Chagas disease. In this regard, IL-17A is believed to control parasitemia and protect against heart disease. In this work, we assessed whether *IL17A* gene polymorphisms are related to infection and/or development of the cardiac form of Chagas disease by genotyping for five *IL17A* SNPs (rs4711998, rs8193036, rs3819024, rs2275913 and rs7747909) in 1171 individuals from a Colombian region endemic for Chagas disease, classified as seronegative ($n=595$), seropositive asymptomatic ($n=175$) and chronic Chagas cardiomyopathy ($n=401$). Our results showed that SNP rs8193036, which is located upstream of the coding region of the gene, was slightly associated with protection against *T. cruzi* infection ($P=0.0170$, $P_{FDR}=0.0851$, odds ratio (OR)=0.80, confidence interval (CI)=0.66–0.96) and associated with protection against the development of cardiomyopathy ($P=0.0065$, $P_{FDR}=0.0324$, OR=0.75, CI=0.60–0.92). This finding suggests that this *IL17A* polymorphism could be associated with *Trypanosoma cruzi* infection and the development of chronic cardiomyopathy due to differential expression of cytokine IL-17A.

Genes and Immunity (2015) 16, 536–540; doi:10.1038/gene.2015.42; published online 15 October 2015

INTRODUCTION

Chagas disease, which is caused by infection of the protozoan *Trypanosoma cruzi*, is recognized by the World Health Organization as one of 13 neglected tropical diseases. It is estimated that 65 million people live in endemic regions and that 6 to 8 million are currently infected, with an incidence of 28 000 cases per year.¹ This disease presents two phases: an acute phase and a chronic phase. The chronic phase comes after the acute phase and most patients will remain asymptomatic and will die from a cause other than Chagas disease. However, around 30% of patients will develop one or two symptomatic forms of the disease, namely chronic cardiomyopathy and/or megacolon.^{2,3}

Human host genetic factors have been suggested to be determinants of the prevalence and clinical forms of Chagas disease.⁴ As such, cytokine and cytokine receptor genes have been studied in order to find any association between genes and the susceptibility and/or development of cardiomyopathy in patients from different endemic countries.⁵ Polymorphisms in genes encoding proinflammatory cytokines such as TNF- α ,^{6,7} lymphotoxin- α ,⁸ and IL18⁹ have been found to be associated with chronic Chagas cardiomyopathy. Similarly, polymorphisms in genes encoding regulatory cytokines such as IL10,¹⁰ chemokines CCL2, CXCL9 and CXCL10, the chemokine receptor CCR5^{11,12} have also been found to be associated with cardiomyopathy. Our group has studied several polymorphisms in Colombian and Peruvian samples in which we found associations with several cytokine genes, especially *IL1B*, *IL12B*, *MIF*, *TGFB* and *IFNG*, and cytokine receptor genes such as *CCR2* and *CCR5*.^{13–22}

Cytokine IL-17A, which is encoded by the *IL17A* gene located on chromosome 6, is involved in the development of inflammation

and host defense against infection by inducing the expression of genes encoding proinflammatory cytokines and chemokines.²³ In Chagas disease, IL-17A has been studied in mouse models and human samples and was shown to control parasitemia levels in mice inoculated with *Trypanosoma cruzi* and to have an important role in modulating the production of IFN- γ and TNF- α , thereby reducing heart damage.²⁴ Knockout mice for *IL17A* gene showed increased parasitemia and died earlier than wild-type mice infected with the parasite.²⁵ A cross-sectional study conducted in individuals from endemic regions in Brazil showed that chronic Chagas cardiomyopathy patients exhibited lower IL-17A expression than both seronegative individuals and indeterminate asymptomatic patients.²⁶

Given the importance of IL-17A in controlling *T. cruzi* infection and protecting against heart tissue damage, we decided to determine whether polymorphisms of the *IL17A* gene are related to a predisposition to infection and/or development of the cardiac form of Chagas disease.

RESULTS

The five *IL17A* SNPs for all subjects in this study were in Hardy–Weinberg equilibrium ($P>0.01$). In order to achieve maximum quality in our study, the data were filtered and those individuals who not reach 50% typing for five SNPs were removed from the analysis. The genotyping rate success was over 95% for the different SNPs. By using expectation–maximization algorithm implemented in Haploview 4.2 software, pairwise linkage disequilibrium and haplotypes were estimated. For all cases, r^2 values were minor than 0.8, indicating possible independent effects.

¹Instituto de Parasitología y Biomedicina López-Neyra, IPBLN-CSIC, P.T.S., Granada, Spain; ²Clinica de Falla Cardíaca y Trasplante, Fundación Cardiovascular de Colombia, Floridablanca, Santander, Colombia and ³Grupo de Inmunología y Epidemiología Molecular, GIEM, Facultad de Salud, Universidad Industrial de Santander, Bucaramanga, Colombia. Correspondence: Dr J Martín, Instituto de Parasitología y Biomedicina López-Neyra, IPBLN-CSIC, P.T. Ciencias de la Salud, Avenida del Conocimiento s/n, 18016 Armilla, Granada, Spain.

E-mail: martin@ipb.csic.es

⁴These authors contributed equally to this work.

Received 29 June 2015; revised 1 September 2015; accepted 8 September 2015; published online 15 October 2015

In order to evaluate the association between *IL17A* gene variant and susceptibility to *T. cruzi* infection, the allelic and genotypic frequencies of seronegative and seropositive individuals were compared using the χ^2 test or a logistic regression analysis (Table 1). The frequency of allele C in rs8193036 was higher in seronegative than in seropositive individuals, with the difference being statistically significant ($P=0.0170$, odds ratio (OR)=0.80, CI=0.66–0.96). However, this significance was lost when applying the Benjamini and Hochberg step up false discovery rate (FDR) correction ($P_{FDR}=0.0851$). Similarly, the genotype C/C frequency for rs8193036 was statistically significantly higher in seronegative individuals when applying additive model analysis, although, as above, significance was lost upon application of the Benjamini and Hochberg correction ($P=0.0321$, $P_{FDR}=0.1606$). For rs2275913, the frequency of allele A was higher in seropositive than in seronegative individuals, with the difference being statistically significant ($P=0.0453$, OR=1.23, CI=1.00–1.51). However, as was the case for rs8193036, this significance was lost after applying the Benjamini and Hochberg correction ($P_{FDR}=0.1133$). The allelic and genotypic frequencies for rs4711998, rs3189024 and rs7747909 were not statistically significantly different when comparing seropositive and seronegative individuals.

Next, and in order to evaluate the possible association between *IL17A* genetic variants and chronic Chagas cardiomyopathy, we compared *IL17A* allelic and genotypic frequencies for seropositive asymptomatic individuals and chronic Chagas cardiomyopathy individuals using the χ^2 test or a logistic regression analysis (Table 2). For *IL17A* rs8193036, the frequency of allele C did not differ significantly when comparing the two groups of individuals.

In contrast, the genotype C/T and T/T frequencies were higher in asymptomatic than in chronic Chagas cardiomyopathy individuals, with these differences being statistically significantly different in the regression model analysis ($P=0.0485$, OR=0.50, CI=0.25–0.99). However, once again, this significance disappeared upon application of the Benjamini and Hochberg correction ($P_{FDR}=0.2424$). The allelic and genotypic frequencies for rs4711998, rs3189024, rs2275913 and rs7747909 were not statistically significantly different when comparing asymptomatic and chronic Chagas cardiomyopathy individuals.

Finally, as our seropositive samples had a proportion of almost three chronic Chagas cardiomyopathy individuals for every asymptomatic subject, we decided to perform an additional analysis by comparing two groups, namely seronegative and chronic Chagas cardiomyopathy individuals (Table 3). In this analysis for *IL17A* rs8193036, the frequency of allele C was higher in seronegative than in seropositive individuals, with this statistically significant difference remaining after application of the Benjamini and Hochberg correction ($P=0.0065$, $P_{FDR}=0.0324$, OR=0.75, CI=0.60–0.92). Genotype C/C and C/T frequencies were higher in seronegative individuals, with significant differences being found in the additive model analysis after application of the Benjamini and Hochberg correction ($P=0.0070$, $P_{FDR}=0.0351$, OR=0.69, CI=0.52–0.90). Significant differences were also observed in the regression model ($P=0.0124$, OR=0.50, CI=0.29–0.86) and dominant model analyses ($P=0.0426$, OR=0.76, CI=0.59–0.99), although in these two models significance was lost when applying the Benjamini and Hochberg correction ($P_{FDR}=0.0618$ and $P_{FDR}=0.2129$, respectively). For *IL17A* and rs4711998,

Table 1. Genotype and allele distribution for *IL17A* polymorphisms in seronegative and seropositive individuals

SNP	112	Group (N)	Genotype. N (%)			MAF %	Allele test		
			111	112	212		P	P_{FDR}	OR (95% CI)
rs4711998	AIG	Seronegative (588)	46 (7.82)	204 (34.69)	338 (57.48)	24.40	0.1992	0.2490	0.88 (0.73–1.07)
		Seropositive (568)	32 (5.63)	196 (34.51)	340 (59.86)	22.89			
rs8193036	CIT	Seronegative (591)	54 (9.14)	215 (36.38)	322 (54.48)	27.33	0.0170	0.0851	0.80 (0.66–0.96)
		Seropositive (569)	35 (6.15)	192 (33.74)	342 (60.11)	23.02			
rs3819024	GIA	Seronegative (588)	26 (4.42)	184 (31.29)	378 (64.29)	20.07	0.9060	0.9060	1.01 (0.83–1.24)
		Seropositive (565)	23 (4.07)	183 (32.39)	359 (63.54)	20.27			
rs2275913	AIG	Seronegative (588)	22 (3.74)	175 (29.76)	391 (66.50)	18.62	0.0453	0.1133	1.23 (1.00–1.51)
		Seropositive (569)	31 (5.45)	188 (33.04)	350 (61.51)	21.97			
rs7747909	AIG	Seronegative (590)	11 (1.86)	132 (22.37)	447 (75.76)	13.05	0.1263	0.2104	1.20 (0.95–1.52)
		Seropositive (570)	17 (2.98)	140 (24.56)	413 (72.46)	15.26			

Abbreviations: CI, confidence interval; OR, odds ratio. Bold entries indicate significant P -values ($P < 0.05$).

Table 2. Genotype and allele distribution for *IL17A* polymorphisms in asymptomatic and chronic Chagas cardiomyopathy (CCC) individuals

SNP	112	Group (N)	Genotype. N (%)			MAF %	Allele test		
			111	112	212		P	P_{FDR}	OR (95% CI)
rs4711998	AIG	Asymptomatic (174)	14 (8.05)	61 (35.06)	99 (56.90)	25.57	0.1519	0.4002	0.81 (0.60–1.08)
		CCC (394)	18 (4.57)	135 (34.26)	241 (61.17)	21.70			
rs8193036	CIT	Asymptomatic (174)	16 (9.20)	57 (32.76)	101 (58.05)	25.57	0.1747	0.4002	0.82 (0.61–1.09)
		CCC (395)	19 (4.81)	135 (34.18)	241 (61.01)	21.90			
rs3819024	GIA	Asymptomatic (170)	9 (5.29)	55 (32.35)	106 (62.35)	21.47	0.5085	0.5058	0.90 (0.66–1.23)
		CCC (395)	14 (3.54)	128 (32.41)	253 (64.05)	19.75			
rs2275913	AIG	Asymptomatic (173)	11 (6.36)	59 (34.10)	103 (59.54)	23.41	0.4374	0.5058	0.89 (0.66–1.20)
		CCC (396)	20 (5.05)	129 (32.58)	247 (62.37)	21.34			
rs7747909	AIG	Asymptomatic (175)	8 (4.57)	44 (25.14)	123 (70.29)	17.14	0.2401	0.4002	0.82 (0.58–1.15)
		CCC (395)	9 (2.28)	96 (24.30)	290 (73.42)	14.43			

Abbreviations: CI, confidence interval; OR, odds ratio.

Table 3. Genotype and allele distribution for *IL17A* polymorphisms in seronegative and chronic Chagas cardiomyopathy (CCC) individuals

SNP	I12	Group (N)	Genotype. N (%)			MAF %	Allele test		
			I11	I12	I2I2		P	P _{FDR}	OR (95% CI)
rs4711998	AIG	Seronegative (588)	46 (7.82)	204 (34.69)	338 (57.48)	24.40	0.0767	0.1917	0.82 (0.66–1.02)
		CCC (394)	18 (4.57)	135 (34.26)	241 (61.17)	21.70			
rs8193036	CIT	Seronegative (591)	54 (9.14)	215 (36.38)	322 (54.48)	27.33	0.0065	0.0324	0.75 (0.60–0.92)
		CCC (395)	19 (4.81)	135 (34.18)	241 (61.01)	21.90			
rs3819024	GIA	Seronegative (588)	26 (4.42)	184 (31.29)	378 (64.29)	20.07	0.8613	0.8613	0.98 (0.78–1.23)
		CCC (395)	14 (3.54)	128 (32.41)	253 (64.05)	19.75			
rs2275913	AIG	Seronegative (588)	22 (3.74)	175 (29.76)	391 (66.50)	18.62	0.1375	0.2292	1.19 (0.95–1.48)
		CCC (396)	20 (5.05)	129 (32.58)	247 (62.37)	21.34			
rs7747909	AIG	Seronegative (590)	11 (1.86)	132 (22.37)	447 (75.76)	13.05	0.3814	0.4767	1.12 (0.87–1.46)
		CCC (395)	9 (2.28)	96 (24.30)	290 (73.42)	14.43			

Bold entries indicate significant *P*-values (*P* < 0.05).

the frequency of genotype A/A was lower in chronic Chagas cardiomyopathy individuals than in seronegative individuals, with this difference being statistically significantly in the additive model analysis (*P* = 0.0389, OR = 0.74, CI = 0.56–0.98). However, significance was lost when applying the Benjamini and Hochberg correction (*P*_{FDR} = 0.0972). No statistically significantly differences were found for any of the other *IL17A* gene SNPs analyzed.

DISCUSSION

IL-17A is produced by several cell lines, including Th17 cells, γδ T cells, Natural Killer T cells, NK cells, neutrophils and eosinophils. As this cytokine is produced by innate and adaptive immune system cells, it has been suggested that there may be a bridging function between two immune responses.²⁷ As IL-17A is a proinflammatory cytokine involved in stimulation of local tissue inflammation,²³ it has been widely studied in the context of infectious diseases. For example, in trypanosomatid protozoa, IL-17A has been shown to be protective against species of the genus *Leishmania*. Similarly, in a study performed in Sudan with individuals infected with *Leishmania donovani*, IL-17 was detected in 80% of resistant individuals, whereas IL-17 was detected in only 30% of individuals who had the lethal visceral form of the disease (Kala Azar) prior to the study. Moreover, IL-17 levels have been shown to be predictive of Kala Azar, with individuals who developed this form of the disease in a period of 6 months during the study having significantly lower levels than individuals who remained resistant to the disease throughout the study.²⁸ Another study in Brazil showed that IL-17 plays a critical role in control of *Leishmania infantum* infection, with knockout mice for IL-17 receptor A showing an increased parasitemia, increased levels of regulatory cytokine IL-10, smaller inflammatory infiltrates and reduced levels of *Irfng*, *Tbet* and *iNOS* mRNA, thereby suggesting that an increased level of IL-17 response may block IL-10 regulatory environment and contribute to a leishmanicidal effect and parasite clearance.²⁹ Similar to *Leishmania*, IL-17 has been shown to be protective against infection and chronic cardiomyopathy development in mice and infected individuals from regions endemic in *Trypanosoma cruzi*. In mouse models, IL-17A is essential for parasite clearance and protection against cardiac damage,^{24,25} and in humans IL-17A levels are directly related to cardiac involvement and infection, being lower in chronic Chagas cardiomyopathy patients than in indeterminate and seronegative patients.²⁶ Another study showed that IL-17A and IFN-γ adequately stimulate macrophages to engulf *T. cruzi* parasites, with the authors proposing that a prolonged residence of the parasite in the endosomal/lysosomal compartment is responsible for parasite death due to continuous exposure to lytic machinery.³⁰ This is similar to the proposal put forward in a study

with another protozoan parasite, namely *Plasmodium berghei*, in mice. In this case, IL-17A was shown to be essential for protection against malaria, with IL-23 inducing macrophages to produce IL-17A and showing an increased survival in wild-type mice compared to knockout mice for IL-23 and IL-17A. IL-17A also stimulates production of the chemokine CCL2/7 and generates a continuous supply of macrophages to the spleen, which might help to efficiently eliminate malaria parasites.³¹

Given the evidence that IL-17A contributes to the control and elimination of different protozoan parasite infections, including *T. cruzi*, we decided to perform an analysis on *IL17A* gene polymorphisms to look for associations with *T. cruzi* infection and/or chronic cardiomyopathy. This is the first work in which *IL17A* gene polymorphisms are evaluated in individuals from an endemic region of Chagas disease. Our results showed that allele C of rs8193036 was associated with protection against infection by *T. cruzi* when comparing seronegative and seropositive individuals (OR = 0.80), as well as being associated with protection against Chagas cardiomyopathy when comparing seronegative and cardiac symptomatic individuals (OR = 0.75). In a previous work, rs8193036 was shown to be related to different levels of IL-17A production, with rs8193036 allele C being associated with lower *IL17A* mRNA expression.³² In light of these findings, it is clear to us that this polymorphism could be associated with differential IL-17A production in patients. However, as our study population is different to previous populations analyzed, we cannot be certain which exact allele or genotype is related to minor or major IL-17A production. Despite this, our results show that rs8193036 is probably in linkage disequilibrium with some causative variant that affects IL-17A production. Owing to our limited number of asymptomatic patients compared with chronic cardiac symptomatic patients, we believe that our analysis does not show any allelic difference when comparing these two groups of patients, simply an association between rs8193036 and protection against cardiac damage when using the recessive model analysis and before application of the Benjamini and Hochberg FDR correction. However, when comparing chronic Chagas cardiomyopathy and seronegative patients, rs8193036 again showed a significant difference between both groups. In our opinion, this result shows that patients who carry allele C of this SNP are protected against *T. cruzi* infection, whereas patients who carry allele T are at risk of both becoming infected and of developing heart disease. A possible limitation in this study could be the marked difference of the average age between the different groups of patients (seronegative and chronic Chagas cardiomyopathy); however, we are confident about the consistency of our results, as the statistical significance was still maintained after performing a logistic regression analysis using age as covariate (*P* = 0.032).

Another *IL17A* SNP, namely rs2275913, has been found to be related to different serum IL-17A levels, with these levels being lower in Chinese patients carrying allele A³³ and higher in Brazilian subjects.³⁴ Moreover, in an *in vitro* analysis, rs2275913 was shown to affect levels of IL-17A produced by stimulated T cells and to affect its binding affinity for a critical transcription factor involved in IL-17A regulation.³⁵ Despite this, our results only showed one significant difference when comparing seropositive and seronegative individuals, although this significance was lost after applying the false discovery rate correction. No differences in allelic and genotypic frequencies of this SNP were found when comparing asymptomatic with chronic Chagas cardiomyopathy individuals or seronegative with chronic Chagas cardiomyopathy individuals.

This study had enough statistical power (~95%) to detect a possible strong association between the analyzed SNPs and the infection by *T. cruzi* for this endemic population considering an OR = 1.5 (Prevalence = 1.44%); nevertheless, a weaker effect of these genetic variants considering an OR = 1.25 lowers the statistical power (~62%). On the other hand, due to the low number of asymptomatic patients in our set of individuals, our study has a middle high statistical power (~77%) to detect a possible strong association to chronic Chagas cardiomyopathy considering an OR = 1.5 when comparing asymptomatic individuals and chronic Chagas cardiomyopathy patients; however, this power lowers (~30%) considering an OR = 1.25.

In conclusion, we believe that *IL17A* rs8193036 could be associated with a susceptibility to Chagas disease and the development of chronic cardiomyopathy. This association could be related to different IL-17A production, which enhances parasite clearance from individuals. However, the lack of functional data supporting our results could be considered a limitation of this study. Further studies on this gene with different populations and larger samples sizes, as well as functional analyses, are needed to validate our findings

MATERIALS AND METHODS

Study subjects

For this study, 1171 individuals from an endemic region for Chagas disease in the provinces of Guantánima and Comunera at the department of Santander localized between 5°26' and 8°08' north and 72°26' and 74°32' west, Colombia, were included. The population in this area of Colombia is a homogeneous mixture, with no specific concentration of any ethnicity. In this zone, symptomatic form of Chagas disease is mainly chronic cardiomyopathy. Samples were collected between 2002 and 2014. These individuals underwent a serological diagnosis for *T. cruzi* infection by way of enzyme-linked immunosorbent assay and a commercial indirect hemagglutination test. According to the results of these tests, 576 individuals were classified as seropositive for *T. cruzi* antigens and 595 were classified as seronegative, with this latter group being used as controls. Subsequently, and based on the results of the clinical evaluation, an electrocardiogram and echocardiogram were recorded to detect any conduction alteration and/or structural cardiomyopathy. As a result, 175 seropositive individuals were classified as asymptomatic and 401 individuals were classified as chronic Chagas cardiomyopathy individuals. From this last group, individuals were classified according to severity of cardiomyopathy as follows: CII ($n = 166$, radiology indicative of light heart hypertrophy or minor ECG alterations), CIII ($n = 200$, moderate heart hypertrophy and considerable ECG alterations, mainly conduction abnormalities) and CIV ($n = 35$, severe cardiomegaly and marked ECG alterations, predominantly frequent and/or complex forms of ventricular arrhythmia). All participants were older than 18 years. The mean age of participants was 45.86 years for seronegative individuals, 58.00 for asymptomatic individuals and 63.14 for chronic Chagas cardiomyopathy patients. The sex distribution for the entire group was 55% female and 45% male.

Ethics statement

The Ethics Committees from the Universidad Industrial de Santander and Fundación Cardiovascular de Colombia approved this study in accordance with the ethical standards laid down in the 1964 Declaration of Helsinki. Written informed consent was obtained from all subjects prior to participation.

Genotyping

Genomic DNA was isolated from 7 ml of an EDTA anticoagulated blood samples using standard salting-out techniques. Five *IL17A* SNPs (rs4711998, rs8193036, rs3819024, rs2275913 and rs7747909) were selected based on a modified version of a previously reported methodology.³⁶ Briefly, using Haploview V4.2,³⁷ SNP selection was performed on the basis of pairwise tagging ($r^2 > 0.80$) and minor allele frequencies > 0.1 , in this case using Colombian–Medellín genotype data from the 1000 genomes project website (<http://www.1000genomes.org>),³⁸ covering the *IL17A* gene and 2 kb upstream. SNPs were genotyped using TaqMan allelic discrimination assays (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA) on a LightCycler 480 real-time PCR system (Roche Diagnostics, Basel, Switzerland).

Statistical analysis

The Hardy–Weinberg equilibrium was determined at a significance level of 0.01 for all groups of individuals. In order to find allelic and genotypic associations, we analyzed allelic and genotypic frequencies by comparing seronegative vs seropositive individuals and asymptomatic vs chronic Chagas cardiomyopathy individuals. An additional comparison was performed between seronegative and chronic Chagas cardiomyopathy individuals. Differences between allele and genotype frequencies in individuals were determined using the χ^2 test and logistic regression analysis when necessary. The Benjamini and Hochberg step up FDR correction was used in all analyses. Odds ratios and 95% confidence intervals were calculated according to Woolf's method. The statistical software package Plink V1.07 (<http://pngu.mgh.harvard.edu/purcell/plink>) was used to perform all analyses.³⁹ A *P*-value of less than 0.05 was considered to be statistically significant. Pairwise linkage disequilibrium (D' and r^2) and haplotypes were estimated using an expectation–maximization algorithm implemented in Haploview 4.2 software.³⁷ Statistical power of our study was calculated by using Power Calculator for Genetic Studies 2006 (CaTS) software (<http://www.sph.umich.edu/csg/abecasis/CaTS/>).

CONFLICT OF INTEREST

The authors declare no conflict of interest.

ACKNOWLEDGEMENTS

This work is part of the doctoral thesis 'Estudio de las bases genéticas de la enfermedad de Chagas' from the Biomedicine PhD program at the Universidad de Granada (Spain). This work has received support from the grant n° 1102-519-29071 from the Departamento Administrativo de Ciencia, Tecnología e Innovación, Colciencias, and the Universidad Industrial de Santander, Bucaramanga, Colombia.

REFERENCES

- 1 PAHO. Washington DC, *Chagas Disease (American Trypanosomiasis)*. Regional Office for the Americas of the World Health Organization: USA, 2014.
- 2 Junqueira C, Caetano B, Bartholomeu DC, Melo MB, Ropert C, Rodrigues MM *et al*. The endless race between Trypanosoma cruzi and host immunity: lessons for and beyond Chagas disease. *Expert Rev Mol Med* 2010; **12**: e29.
- 3 Andrade DV, Gollob KJ, Dutra WO. Acute chagas disease: new global challenges for an old neglected disease. *PLoS Negl Trop Dis* 2014; **8**: e3010.
- 4 Vasconcelos RH, Montenegro SM, Azevedo EA, Gomes YM, Morais CN. Genetic susceptibility to chronic Chagas disease: an overview of single nucleotide polymorphisms of cytokine genes. *Cytokine* 2012; **59**: 203–208.
- 5 Henao-Martinez AF, Schwartz DA, Yang IV. Chagasic cardiomyopathy, from acute to chronic: is this mediated by host susceptibility factors? *Trans R Soc Trop Med Hyg* 2012; **106**: 521–527.
- 6 Pissetti CW, Correia D, de Oliveira RF, Llaguno MM, Balarin MA, Silva-Grecco RL *et al*. Genetic and functional role of TNF-alpha in the development Trypanosoma cruzi infection. *PLoS Negl Trop Dis* 2011; **5**: e976.
- 7 Rodriguez-Perez JM, Cruz-Robles D, Hernandez-Pacheco G, Perez-Hernandez N, Murguía LE, Granados J *et al*. Tumor necrosis factor-alpha promoter polymorphism in Mexican patients with Chagas' disease. *Immunol Lett* 2005; **98**: 97–102.

- 8 Ramasawmy R, Fae KC, Cunha-Neto E, Muller NG, Cavalcanti VL, Ferreira RC *et al*. Polymorphisms in the gene for lymphotoxin-alpha predispose to chronic Chagas cardiomyopathy. *The J Infect Dis* 2007; **196**: 1836–1843.
- 9 Nogueira LG, Frade AF, Ianni BM, Saba B, Lin-Wang HT, Nogueira LG *et al*. Functional IL18 polymorphism and susceptibility to Chronic Chagas Disease. *Cytokine* 2015; **73**: 79–83.
- 10 Costa GC, da Costa Rocha MO, Moreira PR, Menezes CA, Silva MR, Gollob KJ *et al*. Functional IL-10 gene polymorphism is associated with Chagas disease cardiomyopathy. *J Infect Dis* 2009; **199**: 451–454.
- 11 Frade AF, Pissetti CW, Ianni BM, Saba B, Lin-Wang HT, Nogueira LG *et al*. Genetic susceptibility to Chagas disease cardiomyopathy: involvement of several genes of the innate immunity and chemokine-dependent migration pathways. *BMC Infect Dis* 2013; **13**: 587.
- 12 Nogueira LG, Santos RH, Ianni BM, Fiorelli AI, Mairena EC, Benvenuti LA *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; **6**: e1867.
- 13 Calzada JE, Beraun Y, Gonzalez CI, Martin J. Transforming growth factor beta 1 (TGFbeta1) gene polymorphisms and Chagas disease susceptibility in Peruvian and Colombian patients. *Cytokine* 2009; **45**: 149–153.
- 14 Florez O, Zafra G, Morillo C, Martin J, Gonzalez CI. Interleukin-1 gene cluster polymorphism in chagas disease in a Colombian case-control study. *Hum Immunol* 2006; **67**: 741–748.
- 15 Zafra G, Morillo C, Martin J, Gonzalez A, Gonzalez CI. Polymorphism in the 3' UTR of the IL12B gene is associated with Chagas' disease cardiomyopathy. *Microbes Infect* 2007; **9**: 1049–1052.
- 16 Zafra G, Florez O, Morillo CA, Echeverria LE, Martin J, Gonzalez CI. Polymorphisms of toll-like receptor 2 and 4 genes in Chagas disease. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 2008; **103**: 27–30.
- 17 Calzada JE, Nieto A, Beraun Y, Martin J. Chemokine receptor CCR5 polymorphisms and Chagas' disease cardiomyopathy. *Tissue Antigens* 2001; **58**: 154–158.
- 18 Torres OA, Calzada JE, Beraun Y, Morillo CA, Gonzalez CI, Gonzalez A *et al*. Association of the macrophage migration inhibitory factor -173G/C polymorphism with Chagas disease. *Hum Immunol* 2009; **70**: 543–546.
- 19 Torres OA, Calzada JE, Beraun Y, Morillo CA, Gonzalez A, Gonzalez CI *et al*. Role of the IFNG +874T/A polymorphism in Chagas disease in a Colombian population. *Infect Genet Evol* 2010; **10**: 682–685.
- 20 Criado L, Florez O, Martin J, Gonzalez CI. Genetic polymorphisms in TNFA/TNFR2 genes and Chagas disease in a Colombian endemic population. *Cytokine* 2012; **57**: 398–401.
- 21 Machuca MA, Suarez EU, Echeverria LE, Martin J, Gonzalez CI. SNP/haplotype associations of CCR2 and CCR5 genes with severity of chagasic cardiomyopathy. *Hum Immunol* 2014; **75**: 1210–1215.
- 22 Florez O, Martin J, Gonzalez CI. Genetic variants in the chemokines and chemokine receptors in Chagas disease. *Hum Immunol* 2012; **73**: 852–858.
- 23 Iwakura Y, Ishigame H, Saijo S, Nakae S. Functional specialization of interleukin-17 family members. *Immunity* 2011; **34**: 149–162.
- 24 da Matta Guedes PM, Gutierrez FR, Maia FL, Milanezi CM, Silva GK, Pavanelli WR *et al*. IL-17 produced during *Trypanosoma cruzi* infection plays a central role in regulating parasite-induced myocarditis. *PLoS Negl Trop Dis* 2010; **4**: e604.
- 25 Miyazaki Y, Hamano S, Wang S, Shimanoe Y, Iwakura Y, Yoshida H. IL-17 is necessary for host protection against acute-phase *Trypanosoma cruzi* infection. *J Immunol* 2010; **185**: 1150–1157.
- 26 Magalhaes LM, Villani FN, Nunes Mdo C, Gollob KJ, Rocha MO, Dutra WO. High interleukin 17 expression is correlated with better cardiac function in human Chagas disease. *J Infect Dis* 2013; **207**: 661–665.
- 27 Korn T, Bettelli E, Kukula M, Kuchroo VK. IL-17 and Th17 Cells. *Annu Rev Immunol* 2009; **27**: 485–517.
- 28 Pitta MG, Romano A, Cabantous S, Henri S, Hammad A, Kouriba B *et al*. IL-17 and IL-22 are associated with protection against human kala azar caused by *Leishmania donovani*. *J Clin Invest* 2009; **119**: 2379–2387.
- 29 Nascimento MS, Carregaro V, Lima-Junior DS, Costa DL, Ryffel B, Duthie MS *et al*. Interleukin 17A Acts Synergistically With Interferon gamma to Promote Protection Against *Leishmania infantum* Infection. *J Infect Dis* 2015; **211**: 1015–1026.
- 30 Erdmann H, Rossnagel C, Bohme J, Iwakura Y, Jacobs T, Schaible UE *et al*. IL-17A promotes macrophage effector mechanisms against *Trypanosoma cruzi* by trapping parasites in the endolysosomal compartment. *Immunobiology* 2013; **218**: 910–923.
- 31 Ishida H, Imai T, Suzue K, Hirai M, Taniguchi T, Yoshimura A *et al*. IL-23 protection against *Plasmodium berghei* infection in mice is partially dependent on IL-17 from macrophages. *Eur J Immunol* 2013; **43**: 2696–2706.
- 32 Kim SW, Kim ES, Moon CM, Park JJ, Kim TI, Kim WH *et al*. Genetic polymorphisms of IL-23R and IL-17A and novel insights into their associations with inflammatory bowel disease. *Gut* 2011; **60**: 1527–1536.
- 33 Li N, Zhu Q, Li Z, Han Q, Zhang G, Chen J *et al*. IL17A gene polymorphisms, serum IL-17A and IgE levels, and hepatocellular carcinoma risk in patients with chronic hepatitis B virus infection. *Mol Carcinog* 2014; **53**: 447–457.
- 34 Correa JD, Madeira MF, Resende RG, Correia-Silva Jde F, Gomez RS, de Souza Dda G *et al*. Association between polymorphisms in interleukin-17A and -17F genes and chronic periodontal disease. *Mediators Inflamm* 2012; **2012**: 846052.
- 35 Espinoza JL, Takami A, Nakata K, Onizuka M, Kawase T, Akiyama H *et al*. A genetic variant in the IL-17 promoter is functionally associated with acute graft-versus-host disease after unrelated bone marrow transplantation. *PLoS One* 2011; **6**: e26229.
- 36 Nordang GB, Viken MK, Hollis-Moffatt JE, Merriman TR, Forre OT, Helgetveit K *et al*. Association analysis of the interleukin 17A gene in Caucasian rheumatoid arthritis patients from Norway and New Zealand. *Rheumatology (Oxford)* 2009; **48**: 367–370.
- 37 Barrett JC, Fry B, Maller J, Daly MJ. Haploview: analysis and visualization of LD and haplotype maps. *Bioinformatics* 2005; **21**: 263–265.
- 38 Abecasis GR, Auton A, Brooks LD, DePristo MA, Durbin RM, Handsaker RE *et al*. An integrated map of genetic variation from 1,092 human genomes. *Nature* 2012; **491**: 56–65.
- 39 Purcell S, Neale B, Todd-Brown K, Thomas L, Ferreira MA, Bender D *et al*. PLINK: a tool set for whole-genome association and population-based linkage analyses. *Am J Hum Genet* 2007; **81**: 559–575.

7.2. *IL18* Gene Variants Influence the Susceptibility to Chagas Disease



RESEARCH ARTICLE

IL18 Gene Variants Influence the Susceptibility to Chagas Disease

Daniel A Leon Rodríguez¹, F. David Carmona¹, Luis Eduardo Echeverría², Clara Isabel González^{3‡}, Javier Martín^{1‡*}

1 Instituto de Parasitología y Biomedicina López-Neyra, IPBLN-CSIC, P.T.S., Granada, Spain, **2** Clínica de Falla Cardíaca y Trasplante. Fundación Cardiovascular de Colombia, Floridablanca, Santander, Colombia, **3** Grupo de Inmunología y Epidemiología Molecular, GIEM, Facultad de Salud, Universidad Industrial de Santander, Bucaramanga, Colombia

‡ CIG and JM share senior authorship.
* martin@ipb.csic.es



Abstract

Chagas disease is a parasitic disorder caused by the infection with the flagellated protozoan *Trypanosoma cruzi*. According to the World Health Organization, more than six million people are currently infected in endemic regions. Genetic factors have been proposed to influence predisposition to infection and development of severe clinical phenotypes like chronic Chagas cardiomyopathy (CCC). Interleukin 18 (*IL18*) encodes a proinflammatory cytokine that has been proposed to be involved in controlling *T. cruzi* infection. In this study, we analyzed the possible role of six *IL18* gene variants (rs5744258, rs360722, rs2043055, rs187238, rs1946518 and rs360719), which cover most of the variation within the locus, in the susceptibility to infection by *T. cruzi* and/or CCC. In total, 1,171 individuals from a Colombian region endemic for Chagas disease, classified as seronegative (n = 595), seropositive asymptomatic (n = 175) and CCC (n = 401), were genotyped using TaqMan probes. Significant associations with *T. cruzi* infection were observed when comparing seronegative and seropositive individuals for rs187238 (P = 2.18E-03, OR = 0.77), rs360719 (P = 1.49E-03, OR = 0.76), rs2043055 (P = 2.52E-03, OR = 1.29), and rs1946518 (P = 0.0162, OR = 1.22). However, dependence analyses suggested that the association was mainly driven by the polymorphism rs360719. This variant is located within the promoter region of the *IL18* gene, and it has been described that it creates a binding site for the transcription factor OCT-1 affecting *IL-18* expression levels. In addition, no evidence of association was observed between any of the analyzed *IL18* gene polymorphisms and the development of CCC. In summary, our data suggest that genetic variation within the promoter region of *IL18* is directly involved in the susceptibility to infection by *T. cruzi*, which provides novel insight into disease pathophysiology and adds new perspectives to achieve a more effective disease control.

OPEN ACCESS

Citation: Leon Rodríguez DA, Carmona FD, Echeverría LE, González CI, Martín J (2016) *IL18* Gene Variants Influence the Susceptibility to Chagas Disease. PLoS Negl Trop Dis 10(3): e0004583. doi:10.1371/journal.pntd.0004583

Editor: Kenji Hirayama, Institute of Tropical Medicine (NEKKEN), JAPAN

Received: November 21, 2015

Accepted: March 7, 2016

Published: March 30, 2016

Copyright: © 2016 Leon Rodríguez et al. This is an open access article distributed under the terms of the [Creative Commons Attribution License](https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/), which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original author and source are credited.

Data Availability Statement: All relevant data are within the paper and its Supporting Information files.

Funding: This work has received support from the grant no 1102-519-29071 from the Departamento Administrativo de Ciencia, Tecnología e Innovación, Colciencias, <http://www.colciencias.gov.co>, CIG. The funders had no role in study design, data collection and analysis, decision to publish, or preparation of the manuscript.

Competing Interests: The authors have declared that no competing interests exist.

Author Summary

Chagas disease is a parasitic disorder caused by the infection with the protozoan *Trypanosoma cruzi*. In Latin America, this disease represents a major public health concern, as almost 6 million people are currently infected. During the last years, great efforts have been made in health policy to control the disease; however, there is still a long way ahead to achieve this challenging goal. Most affected people remains asymptomatic after infection for the rest of their lives, but around one third of infected people may develop cardiomyopathy, a condition that reduces dramatically the quality of life and life expectancy in Chagas patients. The causes of the marked differential disease outcomes are currently unknown, but it is believed that a genetic predisposition could play a relevant role in the host. We investigated in an endemic region of Colombia whether the *IL18* gene, which is involved in the immune response to intracellular pathogens like *T. cruzi*, is related to a higher susceptibility to infection or disease severity. Our results suggest that *IL18* is a relevant gene in Chagas disease, and could represent a valuable insight that may help to better understand the disease pathogenesis and the development of more efficient therapeutic strategies.

Introduction

Host genetic factors have been suggested to play an important role in the susceptibility to human infectious diseases [1]. An example of such conditions is Chagas disease, which is caused by infection of the protozoan *Trypanosoma cruzi*. Recent estimations indicate that more than 70 million people live in endemic areas for this parasite, with around 6 million people being currently infected and a reported incidence of the disease of almost 30,000 cases [2,3]. Two phases, acute and chronic, are clearly defined in Chagas disease. The early stages are characterized by acute symptoms like fever, headache or swollen lymph nodes. After 8–12 weeks from the bite, infected individuals enter the chronic phase of the disease, in which most of them will remain asymptomatic for the rest of their lives. However, around 30% of patients will develop further symptoms, including chronic cardiomyopathy and/or digestive complications [4]. During the last decade, several studies have investigated the possible role of gene polymorphisms in the predisposition to *T. cruzi* infection and/or chronic Chagas cardiomyopathy in patients from endemic countries, reporting promising results [5–17].

Interleukin 18 (*IL18*) is one of the genes that have been proposed to influence the development of Chagas disease. It encodes a proinflammatory cytokine that was originally described as an interferon-gamma (IFN- γ) inducing factor. Because of this, IL-18 was classified among the Th1-inducing family of cytokines, along with IL-2, IL-12 and IL-15 [18]. Due to its crucial role in the induction of IFN- γ production by T cells and NK cells, thus promoting the Th1 response, IL-18 is considered a relevant molecule for controlling intracellular pathogens [19,20].

In Chagas disease, IFN- γ is essential for parasite control during the early stages of the infection. It has been described that knockout mice for *IFNG* are highly susceptible to infection due to defective macrophage activation and nitric oxide production [21]. Interestingly, mice inoculated with *T. cruzi* displayed elevated IL-18 levels 6 days after infection followed by an increase of IL-12 and IFN γ [22]. Indeed, IL-18 can mediate IFN- γ induction in T cells in an IL-12 independent manner [23].

Consistent with the above, previous studies have suggested a genetic influence of both *IFNG* and *IL18* gene variants in the susceptibility to infection by *T. cruzi* and Chagas cardiomyopathy,

respectively [9,15], adding additional evidences to the high relevance that this pathway may have in Chagas disease development.

Taking into consideration all this knowledge, we decided to perform a comprehensive analysis of the *IL18* variation, in a well-powered cohort from an endemic region of *T. cruzi*, in order to dissect the possible genetic association of the region with predisposition to infection by this parasite and/or the development of cardiomyopathy in Chagas patients.

Materials and Methods

Study subjects

A total of 1,171 Colombian individuals from an endemic region for Chagas disease (Guanentina and Comunera provinces, at the department of Santander localized between 5°26' and 8°08' north and 72°26' and 74°32' west) were included in this study (S1 Fig). The population in this region of Colombia is a homogeneous mixture, with no specific concentration of any ethnicity. All participants underwent a serological diagnosis for *T. cruzi* infection by means of the enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) and a commercial indirect hemagglutination test. According to the results of these tests, 576 individuals were classified as seropositive for *T. cruzi* antigens and 595 were classified as seronegative, with this latter group being used as controls. Subsequently, and based on the results of the clinical evaluation, an electrocardiogram and echocardiogram were recorded to detect any conduction alteration and/or structural cardiomyopathy. As a result, 175 seropositive individuals were classified as asymptomatic and 401 individuals were classified as having chronic Chagas cardiomyopathy. From this last group, Chagas patients were further subclassified accordingly to the severity of cardiomyopathy as follows: CII (n = 166, radiology indicative of light heart hypertrophy or minor ECG alterations), CIII (n = 200, moderate heart hypertrophy and considerable ECG alterations, mainly conduction abnormalities) and CIV (n = 35, severe cardiomegaly and marked ECG alterations, predominantly frequent and/or complex forms of ventricular arrhythmia). The mean age of participants was 45.86 years for seronegative individuals, 58.00 for asymptomatic individuals and 63.14 for chronic Chagas cardiomyopathy patients. The sex distribution for the entire group was 55% female and 45% male. None of the patients included in this study received any treatment (*i.e.* Benznidazole) for the infection.

Ethics statement

The Ethics Committees from the 'Universidad Industrial de Santander and Fundación Cardiovascular de Colombia' approved this study (entitled "*Identificación de factores de riesgo genético para Cardiopatía Chagásica crónica*" [Identification of genetic risk factors for chronic Chagas cardiomyopathy] and approved on June 27th 2005 in the Act No. 15 of 2005) in accordance with the ethical standards laid down in the 1964 Declaration of Helsinki. Written informed consent was obtained from all subjects prior to participation.

SNP selection and genotyping

In order to comprehensively analyze the possible role of *IL18* on the genetic susceptibility to Chagas disease, a total of six single-nucleotide polymorphisms (SNP) within the *locus* were selected for genotyping following a combined candidate gene/tagging strategy. These include: 1) two promoter variants (rs187238 and rs1946518) that have been reported to affect gene expression [24–27]; 2) one intronic variant (rs2043055) previously implicated in Chagas disease outcome in a Brazilian population [15]; 3) an additional promoter variant (rs360719) that has been described to interact with the transcription factor OCT-1 [28]; and 4) two intronic tag

SNPs (rs5744258 and rs360722) covering the remaining variability of the *IL18* gene. These latter variants were selected with the software Haploview V4.2 [29] on the basis of both pairwise tagging ($r^2 > 0.80$) and minor allele frequencies > 0.1 , using Colombian-Medellín (CLM) genotype data from the 1000 genomes phase III project (<http://www.1000genomes.org>) [30], encompassing the coding and promoter regions of *IL18* and considering the four previously selected candidate variants.

Genomic DNA was isolated following standard procedures and the genotyping was performed using TaqMan assays (Applied Biosystems, Foster City, California, USA) on a LightCycler 480 real-time PCR system (Roche Diagnostics, Basel, Switzerland).

Statistical analysis

All statistical analyses were performed with the statistical software package Plink V1.07 (<http://pngu.mgh.harvard.edu/purcell/plink>) [31]. Deviance from Hardy-Weinberg equilibrium was determined at the 1% significance level in all groups of individuals. To test for possible allelic and genotypic associations, we analyzed the allelic, genotypic and haplotypic frequencies by comparing seronegative vs. seropositive individuals and asymptomatic vs. chronic Chagas cardiomyopathy individuals using the χ^2 test and logistic regression analyses, when necessary. The Benjamini & Hochberg step-up false discovery rate (FDR) correction was used in all analyses to control for multiple testing. Permutation tests (10,000 permutations) were also performed in the haplotype analysis to estimate empirical P-values as implemented in Plink. Odds ratios (OR) and 95% confidence intervals (CI) were calculated according to the Woolf's method. P-values lower than 0.05 were considered as statistically significant. Pairwise linkage disequilibrium (LD) (D' and r^2) and haplotypes were estimated using an expectation-maximization algorithm implemented in Haploview. In addition, to determine whether the haplotype model better explained the observed effects than the model considering the individual SNPs, we compared the goodness of fit of both models by a likelihood ratio test as described elsewhere [32].

The statistical power of our study (Table A in [S1 Text](#)) was estimated with the Power Calculator for Genetic Studies 2006 (CaTS) software (<http://www.sph.umich.edu/csg/abecasis/CaTS/>) [33].

Results

The six *IL18* SNPs were in Hardy-Weinberg equilibrium in all the analyzed subgroups ($P > 0.01$), suggesting that a possible inbreed in Guanentina and Comunera provinces is not likely. The genotyping success rate was over 95% and the allele frequencies in all cases were similar to those described for the Colombian population (CLM) of the 1000 genomes phase III project (<http://www.1000genomes.org>) [30]. A relatively high LD was observed throughout the gene in the analyzed population (Fig 1). Particularly, rs187238 and rs360719 showed an r^2 value = 0.98, indicating that these two variants are almost completely linked and, consequently, they may be considered as the same marker for this study.

In order to evaluate the possible association between *IL18* gene variants and susceptibility to *T. cruzi* infection, the allelic and genotypic frequencies of seronegative and seropositive individuals were compared (Table 1). The allelic frequencies of four out of the six *IL18* genetic variants were significantly different between these two groups of individuals. In this regard, rs187238* C and rs360719* C were significantly increased in seronegative individuals compared to the seropositive subset ($P = 2.18E-03$, $P_{FDR} = 5.04E-03$, $OR = 0.77$, $CI = 0.65-0.91$; and $P = 1.49E-03$, $P_{FDR} = 5.04E-03$, $OR = 0.76$, $CI = 0.64-0.90$; respectively), thus suggesting that these variants are associated to protection against infection by *T. cruzi*. On the contrary, the

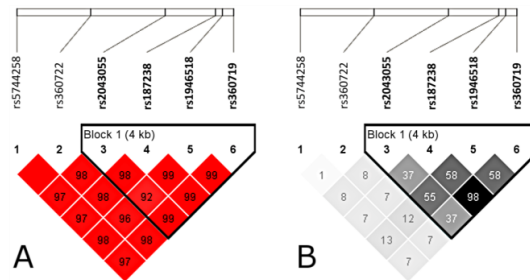


Fig 1. Linkage disequilibrium D' (A) and R-Squared (B) plots estimated by using expectation-maximization algorithm in Haploview V4.2. The analysis revealed that *IL18* genetic variants were in strong LD.

doi:10.1371/journal.pntd.0004583.g001

frequencies of rs2043055**C* and rs1946518**C* were reduced in the seronegative sample set in comparison with the seropositive one ($P = 2.52E-03$, $P_{FDR} = 5.04E-03$, $OR = 1.29$, $CI = 1.10-1.53$; and $P = 0.0162$, $P_{FDR} = 0.0243$, $OR_{1.22}$, $CI = 1.04-1.44$; respectively), indicating that they are associated with a higher infection risk. No statistical significance was observed when the allelic and genotypic frequencies of both rs5744258 and rs360722 were compared between seropositive and seronegative individuals.

The marked difference of the average age between the different subgroups of patients (*i.e.*, seronegative and seropositive individuals) could represent a limitation in this study, as Chagas disease is a parasitic disorder in which patients could develop symptoms many years after the infection [3,4]. To control for this possible confounding factor, we decided to perform a logistic regression analysis accordingly with the serological status using age as covariate. The statistical significance was maintained in this analysis thus supporting the consistency of our results (Table B in S1 Text).

Due to the high LD among the four associated SNPs, which are located either within or nearby the promoter region, dependency of the associations could be masking a possible unique causal variant. To check this, conditional logistic regression analyses were conducted

Table 1. Genotype and allele distribution for *IL18* polymorphisms in seronegative and seropositive individuals.

SNP	1 2	Group (N)	Genotype. N (%)			MAF %	Allele test		
			1 1	1 2	2 2		P	P*	OR [95% CI]
rs5744258	C G	Seronegative (592)	5 (0.84)	127 (21.45)	460 (77.70)	11.57			
		Seropositive (570)	2 (0.35)	128 (22.46)	440 (77.19)	11.58	0.9952	0.9952	1.00 [0.78–1.29]
rs360722	T C	Seronegative (591)	7 (1.18)	123 (20.81)	461 (78.00)	11.59			
		Seropositive (572)	11 (1.92)	119 (20.80)	442 (77.27)	12.33	0.5850	0.7021	1.07 [0.83–1.38]
rs2043055	C T	Seronegative (591)	74 (12.52)	276 (46.70)	241 (40.78)	35.87			
		Seropositive (568)	98 (17.25)	281 (49.47)	189 (33.27)	41.99	2.52E-03	5.04E-03	1.29 [1.10–1.53]
rs187238	C G	Seronegative (590)	101 (17.12)	276 (46.78)	213 (36.10)	40.51			
		Seropositive (572)	67 (11.71)	259 (45.28)	246 (43.01)	34.55	2.18E-03	5.04E-03	0.77 [0.65–0.91]
rs1946518	C A	Seronegative (588)	123 (20.92)	309 (52.55)	156 (26.53)	47.19			
		Seropositive (572)	157 (27.45)	283 (49.48)	132 (23.08)	52.19	0.0162	0.0243	1.22 [1.04–1.44]
rs360719	C T	Seronegative (593)	101 (17.03)	280 (47.22)	212 (35.75)	40.64			
		Seropositive (572)	67 (11.71)	258 (45.10)	247 (43.18)	34.27	1.49E-03	5.04E-03	0.76 [0.64–0.90]

doi:10.1371/journal.pntd.0004583.t001

Table 2. Conditional logistic regression analysis for the IL18 polymorphisms in seronegative and seropositive individuals.

SNP	P-value	P-value add to rs360719	P-value add to rs2043055	P-value add to rs1946518
rs360719 [†]	1.49E-03	NA	0.0996	0.0548
rs2043055	2.52E-03	0.1839	NA	0.1035
rs1946518	0.0162	0.8918	0.6340	NA

[†] Same signal as rs187238

doi:10.1371/journal.pntd.0004583.t002

by conditioning each associated SNP to the remaining variants (except for rs187238 that was almost completely dependent to rs360719). The results of these analyses pointed to rs360719 as the most likely causative variant of the IL18 association with Chagas disease, as the statistical significance of both rs2043055 and rs1946518 were clearly lost after conditioning to it, and a trend was maintained when conditioning rs360719 on these two latter variants (Table 2).

Subsequently, in order to investigate the possible association between IL18 and chronic Chagas cardiomyopathy, we compared the allelic and genotypic frequencies of the IL18 SNPs between seropositive asymptomatic individuals and chronic Chagas cardiomyopathy individuals (Table 3). No statistically significant differences were observed between asymptomatic individuals and chronic Chagasic cardiomyopathy patients for any of the analyzed polymorphisms. In addition, to further evaluate the possible association between IL18 and progression of cardiomyopathy, we compared IL18 allelic and genotypic frequencies by grouping asymptomatic + CII individuals and CIII + CIV individuals; however, similar to that observed in the previous analysis, no statistically significant differences were yielded (Table C in S1 Text).

Finally, we also investigated a possible haplotype effect between the associated SNPs and susceptibility to *T. cruzi* infection (Table 4). Five possible haplotypes were observed (rs2043055|rs187238|rs1946518|rs360719: TCAC, CGCT, TGCT, TGAT and CGAT), with the haplotypes TCAC and CGCT showing the higher frequencies (37.30% and 37.40%, respectively). In relation to the seronegative vs seropositive analysis, the frequency of TCAC was increased in the former individuals, being this difference statistically significant ($P = 1.50E-03$, $P_{FDR} = 7.50E-03$, $OR = 0.76$, $CI = 0.65-0.90$). On the other hand, the frequency of CGCT was

Table 3. Genotype and allele distribution for IL18 polymorphisms in asymptomatic and chronic Chagas cardiomyopathy (CCC) individuals

SNP	1 2	Group (N)	Genotype. N (%)			MAF %	Allele test	
			1 1	1 2	2 2		P	OR [95% CI]
rs5744258	C G	Asymptomatic (175)	0 (0.00)	37 (21.14)	138 (78.86)	10.57	0.4792	1.16 [0.77–1.73]
		CCC (395)	2 (0.51)	91 (23.04)	302 (76.46)	12.03		
rs360722	T C	Asymptomatic (174)	4 (2.30)	29 (16.67)	141 (81.03)	10.63	0.2409	1.26 [0.85–1.88]
		CCC (398)	7 (1.75)	90 (22.56)	301 (75.69)	13.07		
rs2043055	C T	Asymptomatic (173)	36 (20.81)	78 (45.09)	59 (34.10)	43.35	0.5378	0.92 [0.71–1.19]
		CCC (395)	62 (15.70)	203 (51.39)	130 (32.91)	41.39		
rs187238	C G	Asymptomatic (173)	25 (14.45)	74 (42.77)	74 (42.77)	35.84	0.4862	0.91 [0.70–1.19]
		CCC (399)	42 (10.53)	185 (46.37)	172 (43.11)	33.71		
rs1946518	A C	Asymptomatic (175)	45 (25.71)	80 (45.71)	50 (28.57)	48.57	0.7337	0.96 [0.74–1.23]
		CCC (397)	87 (21.91)	203 (51.13)	107 (26.95)	47.48		
rs360719	C T	Asymptomatic (174)	26 (14.94)	75 (43.10)	73 (41.95)	36.49	0.2937	0.87 [0.67–1.13]
		CCC (398)	41 (10.30)	183 (45.98)	174 (43.72)	33.29		

doi:10.1371/journal.pntd.0004583.t003

Table 4. IL18 haplotype analysis of seropositive and seronegative individuals.

Haplotype	Seropositive		Seronegative		P	*P _{FDR}	**P _{PERM}	OR [95% CI]
	N	(%)	N	(%)				
TCAC	391	34.10	479	40.50	1.50E-03	7.50E-03	4.90E-03	0.76 [0.65–0.90]
CGCT	458	40.00	413	35.00	0.0116	0.0290	0.0428	1.25 [1.05–1.47]
TGCT	138	12.10	144	12.20	0.9222	0.9222	1.000	0.99 [0.77–1.27]
TGAT	137	12.00	134	11.30	0.6148	0.7685	0.9758	1.00 [0.89–1.12]
CGAT	18	1.60	12	1.00	0.2262	0.3770	0.6380	1.52 [0.74–3.13]

*Order of SNPs: rs2043055|rs187238|rs1946518|rs360719

*P value after Benjamini & Hochberg step-up false discovery rate correction.

**Permutation test P-value for 10,000 permutations.

doi:10.1371/journal.pntd.0004583.t004

significantly lower in seronegative individuals compared with seropositive individuals ($P = 0.0116$, $P_{FDR} = 0.0290$, $OR = 1.25$, $CI = 1.05–1.47$), whereas the frequencies of TGCT, TGAT, and CGAT did not differ significantly between seropositive and seronegative individuals. Similar results were observed when the haplotype analysis was performed using permutation test with 10,000 permutations instead of Chi-square (Table 4). However, the haplotype model did not better explain the IL18 association to risk of infection than the model considering the SNPs independently (likelihood P-value = 0.1454), indicating no additive effects (that is, the associated haplotypes were a consequence of the independent associations of the considered variants).

In relation to the haplotype analysis according to the presence/absence of chronic Chagas cardiomyopathy and/or to the progression of cardiomyopathy, no statistically significant differences among different subgroups of individuals were observed (Tables D and E in S1 Text).

Discussion

This study evidenced that four genetic variants, namely rs2043055, rs187238, rs1946518 and rs360719, are statistically associated to differential risk of infection by *T. cruzi* in a Colombian population. However, our data suggested that the association is mainly driven by a single SNP, likely rs360719. Evidences supporting this fact include: 1) this IL18 variant showed the most significant P-value and the higher effect size; 2) the statistical significance of both rs2043055 and rs1946518 was lost after conditioning on rs360719, whereas a trend towards significance was clearly observed for rs360719 after conditioning on rs2043055 or rs1946518; 3) no improvement in the goodness of fit for the model considering the association with rs360719 was observed for any of the haplotypic models; and 4) this IL18 variant has a demonstrated functional implication in the gene expression [28].

On the other hand, IL18 does not seem to be involved in later parasitic burden in the tissues of chronic infected patients. It should be noted that the analysis between symptomatic and asymptomatic patients was performed with lower statistical power than that between seronegative and seropositive patients (S1 Table). Hence, a possible type II error may not be rule out. Another possibility could be that additional genetic/environmental factors other than this gene may have a higher relevance for the disease progression [5–7,11–14].

In addition, a lack of association with infection by *T. cruzi* was observed for rs5744258 and rs360722. These two polymorphisms had the lower minor allele frequency and, therefore, their analysis could be limited in terms of statistical power. However, the power considering our study cohort was not reduced (92% to detect associations with $OR = 1.5$ at the 5% significance level)

and the allele frequencies of the tested groups were very similar (rs5744258: 11.57% vs 11.58%, OR = 1.00; rs360722: 11.59% vs 12.33%, OR = 1.07). Analysis of larger cohorts would be required to definitively discard these *IL18* variants as susceptibility markers for Chagas disease.

A possible limitation in the inclusion methodology of our study could be that the seronegative group comprised individuals that underwent a seroconversion. However, in our opinion, it is more likely that seronegative individuals with putative spontaneous cure avoided antibody production due to a quick innate immune response by killer cells and macrophages instead. No consistent seroconversion rates have been reported in Chagas patients so far, and seroconverted individuals were reported only after treatment when there is not persistence in the infection [34–36]. None of the seronegative individuals included in our study were either reported to have Chagas disease or to have a previous therapy.

In addition, it should be noted that there is a considerable high prevalence of cardiac patients in our study cohort, which could suggest that the seropositive population is biased to the patients with Chagas cardiomyopathy. However, we would like to state that the participants were recruited after a medical visit to the endemic area. In this regard, individuals coming to the citation underwent serological analyses, and those showing seropositivity were subsequently subjected to electrocardiograms and further medical analyses in which they were classified as asymptomatic seropositive or CCC patients. In any case, this sample set has been used in previously published studies by our group [13] and we are confident about its homogeneity.

IL-18 is a cytokine which induces IFN- γ production activating several immune cells in response to intracellular pathogens, including *T. cruzi* [20]. IL-18 was shown to play an important role in early immunity to Chagas disease [22,23]. Moreover, the susceptibility to *T. cruzi* depends on the capability of releasing IFN- γ during early stages of infection and this is directly related to release of IL-18 during this phase [37]. Regarding this, it has been reported that rs360719 may be located within a repressor site of the gene, and individuals carrying the C allele showed a higher *IL18* expression due to the creation of a binding site for the transcription factor OCT-1 [28]. This is consistent with the protective role that we observed for this allele in Chagas disease development, and support the hypothesis that major IL-18 levels could increase parasite clearance in early stages of infection. Besides, our results are also in concordance with a previous study performed by our group reporting an association between *IFNG* and susceptibility to infection by *T. cruzi* [9]. Altogether, these findings clearly point to IL-18 along with IFN- γ as crucial players in the immune response against infection by this parasite. In any case, additional functional analyses are needed to confirm this assumption, and to have an accurate estimation of the putative IL-18 and IFN- γ levels that may discriminate the different subgroups of Chagas patients from each other and from the healthy population.

On the other hand, a previous study showed that *IL18* rs2043055 may modulate Chagas disease severity in a Brazilian population [15]. In our study we were not able to find an association of any of the analyzed *IL18* SNPs (including this one) with the severity of Chagas disease. We speculate that the discrepancy could be due to a different genetic background between the analyzed cohorts from Brazil and Colombia. Despite being both populations a mixture from Amerindian, west-European and African populations, the proportion of these ancestries could differ between them, which would affect the LD and haplotypic block architecture across the genome [38–40]. It would be interesting, therefore, to examine whether the association described for rs2043055 is dependent upon rs360719 in the Brazilian population, as our data suggest based on the LD structure observed in our Colombian cohort. In any case, both studies open a new window to understand differences in Chagas disease outcome and susceptibility. Another explanation for the observed differences between both studies could be the existence of different *T. cruzi* strains in the studied regions from Colombia and Brazil, as the two strains present in such areas (I and II, respectively) have been described to be implicated in CCC

development and severity [41]. The analysis of the specific strains affecting both our population and the Brazilian one was out of the scope of this study, but it could represent an interesting future complementary analysis to this reported here.

The influence of *IL18* gene variants on the susceptibility to infection or severity of other protozoan infectious diseases has been also evaluated. In this context, a weak association between the *IL18* SNP rs1946519, and a higher risk to develop Leishmaniasis was described in Iranians [42]. Nevertheless, the authors did not find evidence of association between Leishmania infection and rs187238, which was associated with *T. cruzi* infection in our study. As stated before, the discrepancy could be due to population-specific genetic architectures within the gene, but also to the fact that our study had a considerably higher statistical power.

Additionally, the possible role of the *IL18* gene variants rs187238 and rs1946518 in severe malaria anemia and mortality were also investigated in a Kenyan children population [43]. The authors of that study observed that homozygosity for the rs1946518*A allele conferred protection against severe malaria, and that the allelic combination of rs187238*G and rs19463518*C had a higher frequency in the severe malaria group compared to the non-severe group [43]. In our study, the frequency of the AA genotype for rs1946518 was increased in asymptomatic individuals compared to chronic Chagas cardiomyopathy patients, but this difference was not statistically significant. Similarly, the frequency of the rs187238*G|rs19463518*C haplotype was increased in chronic cardiomyopathy individuals compared with asymptomatic patients, although the difference did not reach statistical significance either. Additional studies encompassing larger cohorts of seropositive patients with different degrees of disease severity may shed light into these putative associations.

IL18 gene variants have also been evaluated in other infectious conditions such as hepatitis B or C viruses. Cumulating data indicate that IL-18 may influence the clearing of the viral load [44–46], as well as the severity of the infection in some cases of hepatic carcinomas or cirrhosis [26,47,48]. In this context, it has been proposed that differential expression levels of *IL18* could be directly involved in the predisposition to infection by the above mentioned viruses and in the severity of hepatitis [26,44–48], consistent with what we observed in Chagasic patients.

In conclusion, our results suggest that *IL18* variation plays an important role in the susceptibility to infection by *T. cruzi*, probably by influencing IL-18 production during the immune response in the early stages of the infection. The promoter polymorphism rs360719 is likely the causal variant of this association, at least in the Colombian population. In any case, further studies on this gene on different ancestries and larger samples sizes, as well functional analyses, would be desirable to validate our findings.

Supporting Information

S1 Fig. Location of the Colombian endemic regions analyzed in this study (Guanentina and Comunera).

(TIF)

S1 Text. Supporting information tables. Table A. Statistical power calculation considering different effect sizes; Table B. Logistic regression analysis of *IL18* polymorphisms in seronegative and seropositive individuals including age as covariate; Table C. Genotype and allele distribution for *IL18* polymorphisms in early chronic Chagas cardiomyopathy (Asymptomatic + CII) and advanced chronic Chagas cardiomyopathy (CIII+CIV) individuals; Table D. *IL18* haplotype analysis of asymptomatic and chronic Chagas cardiomyopathy individuals; Table E. *IL18* haplotype analysis of early chronic Chagas cardiomyopathy (Asymptomatic + CII) and advanced chronic Chagas cardiomyopathy (CIII+CIV) individuals.

(DOCX)

Acknowledgments

This work is part of the doctoral thesis “Estudio de las bases genéticas de la enfermedad de Chagas” from the Biomedicine PhD program at the Universidad de Granada (Spain).

Author Contributions

Conceived and designed the experiments: DALR FDC JM. Performed the experiments: DALR. Analyzed the data: DALR FDC. Contributed reagents/materials/analysis tools: CIG LEE JM. Wrote the paper: DALR FDC CIG JM.

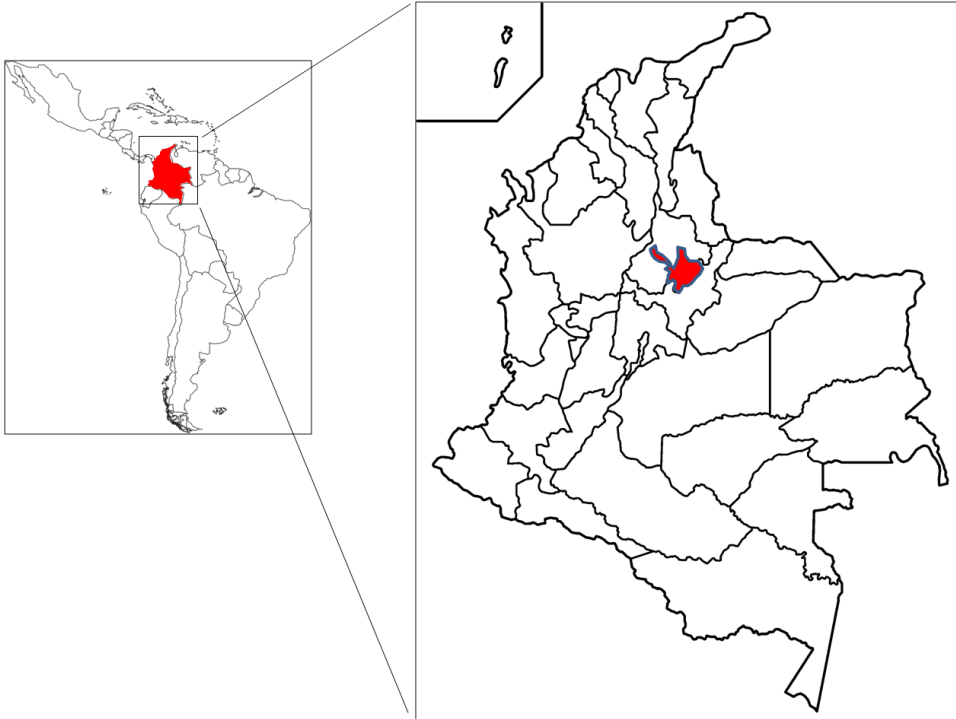
References

1. Chapman SJ, Hill AV (2012) Human genetic susceptibility to infectious disease. *Nat Rev Genet* 13: 175–188. doi: [10.1038/nrg3114](https://doi.org/10.1038/nrg3114) PMID: [22310894](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/22310894/)
2. (2015) Chagas disease in Latin America: an epidemiological update based on 2010 estimates. *Wkly Epidemiol Rec* 90: 33–43. PMID: [25671846](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/25671846/)
3. Bern C (2015) Chagas' Disease. *N Engl J Med* 373: 456–466. doi: [10.1056/NEJMra1410150](https://doi.org/10.1056/NEJMra1410150) PMID: [26222561](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/26222561/)
4. Rassi A Jr., Rassi A, Marin-Neto JA (2010) Chagas disease. *Lancet* 375: 1388–1402. doi: [10.1016/S0140-6736\(10\)60061-X](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(10)60061-X) PMID: [20399979](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/20399979/)
5. Calzada JE, Nieto A, Beraun Y, Martin J (2001) Chemokine receptor CCR5 polymorphisms and Chagas' disease cardiomyopathy. *Tissue Antigens* 58: 154–158. PMID: [11703822](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/11703822/)
6. Florez O, Zafra G, Morillo C, Martin J, Gonzalez CI (2006) Interleukin-1 gene cluster polymorphism in chagas disease in a Colombian case-control study. *Hum Immunol* 67: 741–748. PMID: [17002905](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/17002905/)
7. Zafra G, Morillo C, Martin J, Gonzalez A, Gonzalez CI (2007) Polymorphism in the 3' UTR of the IL12B gene is associated with Chagas' disease cardiomyopathy. *Microbes Infect* 9: 1049–1052. PMID: [17644387](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/17644387/)
8. Calzada JE, Beraun Y, Gonzalez CI, Martin J (2009) Transforming growth factor beta 1 (TGFbeta1) gene polymorphisms and Chagas disease susceptibility in Peruvian and Colombian patients. *Cytokine* 45: 149–153. doi: [10.1016/j.cyto.2008.11.013](https://doi.org/10.1016/j.cyto.2008.11.013) PMID: [19136278](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/19136278/)
9. Torres OA, Calzada JE, Beraun Y, Morillo CA, Gonzalez A, et al. (2010) Role of the IFNG +874T/A polymorphism in Chagas disease in a Colombian population. *Infect Genet Evol* 10: 682–685. doi: [10.1016/j.meegid.2010.03.009](https://doi.org/10.1016/j.meegid.2010.03.009) PMID: [20359550](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/20359550/)
10. Florez O, Martin J, Gonzalez CI (2012) Genetic variants in the chemokines and chemokine receptors in Chagas disease. *Hum Immunol* 73: 852–858. doi: [10.1016/j.humimm.2012.04.005](https://doi.org/10.1016/j.humimm.2012.04.005) PMID: [22537745](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/22537745/)
11. Criado L, Florez O, Martin J, Gonzalez CI (2012) Genetic polymorphisms in TNFA/TNFR2 genes and Chagas disease in a Colombian endemic population. *Cytokine* 57: 398–401. doi: [10.1016/j.cyto.2011.12.007](https://doi.org/10.1016/j.cyto.2011.12.007) PMID: [22221522](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/22221522/)
12. Machuca MA, Suarez EU, Echeverria LE, Martin J, Gonzalez CI (2014) SNP/haplotype associations of CCR2 and CCR5 genes with severity of chagasic cardiomyopathy. *Hum Immunol* 75: 1210–1215. doi: [10.1016/j.humimm.2014.09.023](https://doi.org/10.1016/j.humimm.2014.09.023) PMID: [25312802](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/25312802/)
13. Leon Rodriguez DA, Echeverria LE, Gonzalez CI, Martin J (2015) Investigation of the role of IL17A gene variants in Chagas disease. *Genes Immun* 16: 536–540. doi: [10.1038/gene.2015.42](https://doi.org/10.1038/gene.2015.42) PMID: [26468780](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/26468780/)
14. Cunha-Neto E, Chevillard C (2014) Chagas disease cardiomyopathy: immunopathology and genetics. *Mediators Inflamm* 2014: 683230. doi: [10.1155/2014/683230](https://doi.org/10.1155/2014/683230) PMID: [25210230](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/25210230/)
15. Nogueira LG, Frade AF, Ianni BM, Laugier L, Pissetti CW, et al. (2015) Functional IL18 polymorphism and susceptibility to Chronic Chagas Disease. *Cytokine* 73: 79–83. doi: [10.1016/j.cyto.2015.01.037](https://doi.org/10.1016/j.cyto.2015.01.037) PMID: [25743241](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/25743241/)
16. Vasconcelos RH, Montenegro SM, Azevedo EA, Gomes YM, Morais CN (2012) Genetic susceptibility to chronic Chagas disease: an overview of single nucleotide polymorphisms of cytokine genes. *Cytokine* 59: 203–208. doi: [10.1016/j.cyto.2012.04.035](https://doi.org/10.1016/j.cyto.2012.04.035) PMID: [22595647](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/22595647/)
17. Ayo CM, Dalalio MM, Visentainer JE, Reis PG, Sippert EA, et al. (2013) Genetic susceptibility to Chagas disease: an overview about the infection and about the association between disease and the immune response genes. *Biomed Res Int* 2013: 284729. doi: [10.1155/2013/284729](https://doi.org/10.1155/2013/284729) PMID: [24069594](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/24069594/)
18. Dinarello CA (1999) IL-18: A TH1-inducing, proinflammatory cytokine and new member of the IL-1 family. *J Allergy Clin Immunol* 103: 11–24. PMID: [9893178](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/9893178/)

19. Nakanishi K, Yoshimoto T, Tsutsui H, Okamura H (2001) Interleukin-18 is a unique cytokine that stimulates both Th1 and Th2 responses depending on its cytokine milieu. *Cytokine Growth Factor Rev* 12: 53–72. PMID: [11312119](#)
20. Sugawara I (2000) Interleukin-18 (IL-18) and infectious diseases, with special emphasis on diseases induced by intracellular pathogens. *Microbes Infect* 2: 1257–1263. PMID: [11008115](#)
21. Holscher C, Kohler G, Muller U, Mossmann H, Schaub GA, et al. (1998) Defective nitric oxide effector functions lead to extreme susceptibility of *Trypanosoma cruzi*-infected mice deficient in gamma interferon receptor or inducible nitric oxide synthase. *Infect Immun* 66: 1208–1215. PMID: [9488415](#)
22. Meyer Zum Buschenfelde C, Cramer S, Trumpfheller C, Fleischer B, Frosch S (1997) *Trypanosoma cruzi* induces strong IL-12 and IL-18 gene expression in vivo: correlation with interferon-gamma (IFN-gamma) production. *Clin Exp Immunol* 110: 378–385. PMID: [9409639](#)
23. Muller U, Kohler G, Mossmann H, Schaub GA, Alber G, et al. (2001) IL-12-independent IFN-gamma production by T cells in experimental Chagas' disease is mediated by IL-18. *J Immunol* 167: 3346–3353. PMID: [11544324](#)
24. Thompson SR, Humphries SE (2007) Interleukin-18 genetics and inflammatory disease susceptibility. *Genes Immun* 8: 91–99. PMID: [17215860](#)
25. Giedraitis V, He B, Huang WX, Hillert J (2001) Cloning and mutation analysis of the human IL-18 promoter: a possible role of polymorphisms in expression regulation. *J Neuroimmunol* 112: 146–152. PMID: [11108943](#)
26. Bouzgarrou N, Hassen E, Schvoerer E, Stoll-Keller F, Bahri O, et al. (2008) Association of interleukin-18 polymorphisms and plasma level with the outcome of chronic HCV infection. *J Med Virol* 80: 607–614. doi: [10.1002/jmv.21079](#) PMID: [18297714](#)
27. Sakai K, Kita M, Sawai N, Shiomi S, Sumida Y, et al. (2008) Levels of interleukin-18 are markedly increased in *Helicobacter pylori*-infected gastric mucosa among patients with specific IL18 genotypes. *J Infect Dis* 197: 1752–1761. doi: [10.1086/588196](#) PMID: [18442334](#)
28. Sanchez E, Palomino-Morales RJ, Ortego-Centeno N, Jimenez-Alonso J, Gonzalez-Gay MA, et al. (2009) Identification of a new putative functional IL18 gene variant through an association study in systemic lupus erythematosus. *Hum Mol Genet* 18: 3739–3748. doi: [10.1093/hmg/ddp301](#) PMID: [19584085](#)
29. Barrett JC, Fry B, Maller J, Daly MJ (2005) Haploview: analysis and visualization of LD and haplotype maps. *Bioinformatics* 21: 263–265. PMID: [15297300](#)
30. Abecasis GR, Auton A, Brooks LD, DePristo MA, Durbin RM, et al. (2012) An integrated map of genetic variation from 1,092 human genomes. *Nature* 491: 56–65. doi: [10.1038/nature11632](#) PMID: [23128226](#)
31. Purcell S, Neale B, Todd-Brown K, Thomas L, Ferreira MA, et al. (2007) PLINK: a tool set for whole-genome association and population-based linkage analyses. *Am J Hum Genet* 81: 559–575. PMID: [17701901](#)
32. Carmona FD, Martin JE, Beretta L, Simeon CP, Carreira PE, et al. (2013) The systemic lupus erythematosus IRF5 risk haplotype is associated with systemic sclerosis. *PLoS One* 8: e54419. doi: [10.1371/journal.pone.0054419](#) PMID: [23372721](#)
33. Skol AD, Scott LJ, Abecasis GR, Boehnke M (2006) Joint analysis is more efficient than replication-based analysis for two-stage genome-wide association studies. *Nat Genet* 38: 209–213. PMID: [16415888](#)
34. Escriba JM, Ponce E, Romero Ade D, Vinas PA, Marchiol A, et al. (2009) Treatment and seroconversion in a cohort of children suffering from recent chronic Chagas infection in Yoro, Honduras. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 104: 986–991. PMID: [20027465](#)
35. Alvarez MG, Vigliano C, Lococo B, Petti M, Bertocchi G, et al. (2012) Seronegative conversion after incomplete benznidazole treatment in chronic Chagas disease. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 106: 636–638. doi: [10.1016/j.trstmh.2012.07.010](#) PMID: [22898619](#)
36. Sguassero Y, Cuesta CB, Roberts KN, Hicks E, Comande D, et al. (2015) Course of Chronic *Trypanosoma cruzi* Infection after Treatment Based on Parasitological and Serological Tests: A Systematic Review of Follow-Up Studies. *PLoS One* 10: e0139363. doi: [10.1371/journal.pone.0139363](#) PMID: [26436678](#)
37. Antunez MI, Cardoni RL (2001) Early IFN-gamma production is related to the presence of interleukin (IL)-18 and the absence of IL-13 in experimental *Trypanosoma cruzi* infections. *Immunol Lett* 79: 189–196. PMID: [11600197](#)
38. Yunis JJ, Garcia O, Uriarte I, Yunis EJ (2000) Population data on 6 short tandem repeat loci in a sample of Caucasian-Mestizos from Colombia. *Int J Legal Med* 113: 175–178. PMID: [10876992](#)

39. Sanchez-Diz P, Acosta MA, Fonseca D, Fernandez M, Gomez Y, et al. (2009) Population data on 15 autosomal STRs in a sample from Colombia. *Forensic Sci Int Genet* 3: e81–82. doi: [10.1016/j.fsigen.2008.08.002](https://doi.org/10.1016/j.fsigen.2008.08.002) PMID: [19414157](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/19414157/)
40. Ruiz-Linares A, Adhikari K, Acuna-Alonzo V, Quinto-Sanchez M, Jaramillo C, et al. (2014) Admixture in Latin America: geographic structure, phenotypic diversity and self-perception of ancestry based on 7,342 individuals. *PLoS Genet* 10: e1004572. doi: [10.1371/journal.pgen.1004572](https://doi.org/10.1371/journal.pgen.1004572) PMID: [25254375](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/25254375/)
41. Zingales B, Miles MA, Campbell DA, Tibayrenc M, Macedo AM, et al. (2012) The revised *Trypanosoma cruzi* subspecific nomenclature: rationale, epidemiological relevance and research applications. *Infect Genet Evol* 12: 240–253. doi: [10.1016/j.meegid.2011.12.009](https://doi.org/10.1016/j.meegid.2011.12.009) PMID: [22226704](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/22226704/)
42. Moravej A, Rasouli M, Asaei S, Kalani M, Mansoori Y (2013) Association of interleukin-18 gene variants with susceptibility to visceral leishmaniasis in Iranian population. *Mol Biol Rep* 40: 4009–4014. doi: [10.1007/s11033-012-2479-x](https://doi.org/10.1007/s11033-012-2479-x) PMID: [23269628](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/23269628/)
43. Anyona SB, Kempaiah P, Raballah E, Ouma C, Were T, et al. (2011) Functional promoter haplotypes of interleukin-18 condition susceptibility to severe malarial anemia and childhood mortality. *Infect Immun* 79: 4923–4932. doi: [10.1128/IAI.05601-11](https://doi.org/10.1128/IAI.05601-11) PMID: [21969001](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/21969001/)
44. An P, Thio CL, Kirk GD, Donfield S, Goedert JJ, et al. (2008) Regulatory polymorphisms in the interleukin-18 promoter are associated with hepatitis C virus clearance. *J Infect Dis* 198: 1159–1165. doi: [10.1086/592047](https://doi.org/10.1086/592047) PMID: [18781864](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/18781864/)
45. Cheong JY, Cho SW, Oh B, Kimm K, Lee KM, et al. (2010) Association of interleukin-18 gene polymorphisms with hepatitis B virus clearance. *Dig Dis Sci* 55: 1113–1119. doi: [10.1007/s10620-009-0819-z](https://doi.org/10.1007/s10620-009-0819-z) PMID: [19466545](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/19466545/)
46. Yue M, Wang JJ, Tang SD, Feng L, Zhang Y, et al. (2013) Association of interleukin-18 gene polymorphisms with the outcomes of hepatitis C virus infection in high-risk Chinese Han population. *Immunol Lett* 154: 54–60. doi: [10.1016/j.imlet.2013.08.007](https://doi.org/10.1016/j.imlet.2013.08.007) PMID: [23978570](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/23978570/)
47. Kim YS, Cheong JY, Cho SW, Lee KM, Hwang JC, et al. (2009) A functional SNP of the Interleukin-18 gene is associated with the presence of hepatocellular carcinoma in hepatitis B virus-infected patients. *Dig Dis Sci* 54: 2722–2728. doi: [10.1007/s10620-009-0970-6](https://doi.org/10.1007/s10620-009-0970-6) PMID: [19757044](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/19757044/)
48. Migita K, Sawakami-Kobayashi K, Maeda Y, Nakao K, Kondoh S, et al. (2009) Interleukin-18 promoter polymorphisms and the disease progression of Hepatitis B virus-related liver disease. *Transl Res* 153: 91–96. doi: [10.1016/j.trsl.2008.11.008](https://doi.org/10.1016/j.trsl.2008.11.008) PMID: [19138654](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/19138654/)

S1 Figure. Location of the Colombian endemic regions analyzed in this study (Guanentina and Comunera).



1 **Table A. Statistical power calculation considering different effect sizes.**

2

	Statistical power calculation	
	<i>T. cruzi</i> infection (595/576)*	Chronic Chagasic cardiomyopathy (175/401)**
OR=1.50	100%	88%
OR=1.25	77%	41%
OR=1.10	20%	11%

3

4 The estimation was performed considering a prevalence of 1.44% and a minor allele frequency
5 of 35%.

6 *Analysis performed by using 595 seronegative vs. 576 seropositive individuals.

7 **Analysis performed by using 175 asymptomatic vs. 401 chronic Chagas cardiomyopathy
8 individuals.

9

10

11 **Table B. Logistic regression analysis of *IL18* polymorphisms in seronegative and**
 12 **seropositive individuals including age as covariate.**

13

SNP	I 2	Group (N)	MAF %	Allele test /Age		
				P	P*	OR [95% CI]
rs5744258	C G	Seronegative (592)	11.57			
		Seropositive (570)	11.58	0.7581	0.7581	1.05 [0.77-1.42]
rs360722	T C	Seronegative (591)	11.59			
		Seropositive (572)	12.33	0.6779	0.7581	1.06 [0.80-1.42]
rs2043055	C T	Seronegative (591)	35.87			
		Seropositive (568)	41.99	6.45E-03	0.0129	1.31 [1.08-1.58]
rs187238	C G	Seronegative (590)	40.51			
		Seropositive (572)	34.55	3.03E-03	9.09E-03	0.75 [0.62-0.91]
rs1946518	C A	Seronegative (588)	47.19			
		Seropositive (572)	52.19	0.0220	0.0330	1.25 [1.03-1.51]
rs360719	C T	Seronegative (593)	40.64			
		Seropositive (572)	34.27	1.88E-03	9.09E-03	0.74 [0.61-0.89]

14

15 **Table C. Genotype and allele distribution for *IL18* polymorphisms in early chronic Chagas cardiomyopathy (Asymptomatic + CII) and**
 16 **advanced chronic Chagas cardiomyopathy (CIII+CIIV) individuals.**

17

SNP	I12	Group (N)	Genotype. N (%)				MAF %	P	Allele test	
			I11	I12	212	212			OR	95% CI1
rs5744258	C G	Asy+CII (332)	1 (0.30)	74 (22.29)	257 (77.41)	11.45				
		CIII+CIIV (238)	1 (0.42)	54 (22.69)	183 (76.89)	11.76	0.8682	1.03	[0.71-1.49]	
rs360722	T C	Asy+CII (334)	8 (2.40)	63 (18.86)	263 (78.74)	11.83				
		CIII+CIIV (238)	3 (1.26)	56 (23.53)	179 (75.21)	13.03	0.5432	1.12	[0.78-1.59]	
rs2043055	C T	Asy+CII (331)	59 (17.82)	160 (48.34)	112 (33.84)	41.99				
		CIII+CIIV (237)	39 (16.46)	121 (51.05)	77 (32.49)	41.98	0.9971	1.00	[0.79-1.27]	
rs187238	C G	Asy+CII (333)	43 (12.91)	145 (43.54)	145 (43.54)	34.68				
		CIII+CIIV (239)	24 (10.04)	114 (47.70)	101 (42.26)	33.89	0.7805	0.97	[0.75-1.24]	
rs1946518	A C	Asy+CII (333)	83 (24.92)	153 (45.95)	97 (29.13)	47.90				
		CIII+CIIV (239)	49 (20.50)	130 (54.39)	60 (25.10)	47.70	0.9470	0.99	[0.78-1.26]	
rs360719	C T	Asy+CII (332)	43 (12.95)	144 (43.73)	145 (43.67)	34.64				
		CIII+CIIV (240)	24 (10.00)	114 (47.50)	102 (42.50)	33.75	0.7547	0.96	[0.75-1.23]	

18 **Table D. *IL18* haplotype analysis of asymptomatic and chronic Chagas**
 19 **cardiomyopathy individuals.**

Haplotype [‡]	Asymptomatic		CCC		P	OR [95% CI]
	N	(%)	N	(%)		
CGCT	143	40.90	315	39.50	0.6614	0.94 [0.73-1.22]
TCAC	125	35.60	265	33.30	0.4534	0.89 [0.69-1.16]
TGCT	36	10.20	102	12.90	0.2106	1.26 [0.84-1.88]
TGAT	38	10.70	100	12.50	0.3952	1.00 [0.84-1.19]
CGAT	6	1.80	12	1.40	0.6218	0.81 [0.31-2.12]

20 [‡]Order of SNPs: rs2043055|rs187238|rs1946518|rs360719

21

22

23 **Table E. *IL18* haplotype analysis of early chronic Chagas cardiomyopathy**
 24 **(Asymptomatic + CII) and advanced chronic Chagas cardiomyopathy (CIII+CIV)**
 25 **individuals.**

Haplotype [‡]	Asy + CII		CIII + CIV		P	OR [95% CI]
	N	(%)	N	(%)		
CGCT	266	39.90	191	40.00	0.9603	1.00 [0.79-1.27]
TCAC	229	34.30	161	33.60	0.7988	0.97 [0.76-1.24]
TGCT	80	11.90	59	12.30	0.8518	1.03 [0.72-1.48]
TGAT	79	11.80	58	12.10	0.8828	1.00 [0.85-1.18]
CGAT	10	1.50	8	1.70	0.7950	1.14 [0.46-2.84]

26 [‡]Order of SNPs: rs2043055|rs187238|rs1946518|rs360719

27

7.3. Analysis of association of *FOXO3* gene with *Trypanosoma cruzi* infection and chronic Chagasic cardiomyopathy

BRIEF COMMUNICATION

Analysis of association of *FOXO3* gene with *Trypanosoma cruzi* infection and chronic Chagasic cardiomyopathy

D. A. Leon Rodriguez¹, C. I. González^{2,†} & J. Martin^{1,†}

¹ Instituto de Parasitología y Biomedicina López-Neyra, IPBLN-CSIC, Granada, Spain

² Grupo de Inmunología y Epidemiología Molecular, GIEM, Facultad de Salud, Universidad Industrial de Santander, Bucaramanga, Colombia

Key words

Chagas disease; single nucleotide polymorphism; *FOXO3*; rs12212067; genetics

Correspondence

Javier Martin
Instituto de Parasitología y Biomedicina
López-Neyra
IPBLN-CSIC
P.T. Ciencias de la Salud, Avenida del
Conocimiento s/n 18016
Armillá-Granada
Spain
Tel: +34 958 181669
Fax: +34 958 181332
e-mail: martin@ipb.csic.ess

Received 27 January 2016; revised 4 March 2016; accepted 6 April 2016

doi: 10.1111/tan.12808

Abstract

FOXO3, a member of the Forkhead family of proteins, plays a role in controlling immune response. *FOXO3* gene variant rs12212067 has been associated to differential severity of infectious diseases like malaria. In this study, we assessed whether this *FOXO3* gene polymorphism is related to susceptibility to infection by *Trypanosoma cruzi* and/or chronic Chagasic cardiomyopathy. A total of 1171 individuals from a Colombian region endemic for Chagas disease, classified as seronegative ($n = 595$), seropositive asymptomatic ($n = 175$) and chronic Chagasic cardiomyopathy ($n = 401$) were genotyped for the *FOXO3* rs12212067 using TaqMan allelic discrimination. Our results showed no statistically significant differences between allelic and genotypic frequencies of rs12212067 in seronegative individuals compared with seropositive individuals. Similarly, we observed no evidence of association when asymptomatic individuals were compared with chronic Chagasic cardiomyopathy patients. Our data suggest that the *FOXO3* genetic variant rs12212067 do not play an important role in Chagas disease.

In many human infections, only a proportion of exposed individuals develop clinical disease. Due to this, host genetic factors have suggested to play an important role in susceptibility to infectious diseases (1). Chagas disease is caused by the infection of the protozoan *Trypanosoma cruzi*. Nowadays, around 70 million people live in endemic regions and 6 million people are currently infected with an incidence of 30,000 cases (2). This disease presents two phases: a short acute phase and a chronic phase. The chronic phase presents two forms, the first form is asymptomatic in which ~70% of the patients will remain without any complication and will die about another cause different to Chagas disease. On the other hand, the symptomatic form presents cardiac and/or digestive complications and most symptomatic patients die due to chronic Chagasic cardiomyopathy (3). During the last years, it is widely accepted that the different parasitic strains, environmental, and nutritional factors may be the principal causes of differences during the chronic phase of the disease. However, one study performed in familial clusters in Brazil displayed evidence that genetic factors may influence both, seropositivity and cardiac

outcome traits, and additional data showed that heritability were 0.56 (4). In line with this, several genetic variants of immune genes have been analyzed in endemic populations finding some associations to risk to infection and/or differential predisposition to the severity of Chagas disease (5–7). To date, only one genome wide association study (GWAS) has been performed on Chagasic patients; nevertheless, due to technical limitations there was not conclusive results indicating any association to severity of disease (8).

FOXO transcription factors belong to the Forkhead family of proteins and are involved in different cellular responses including apoptosis, cell cycle arrest, differentiation and resistance to oxidative stress (9). Particularly, FOXO3 plays a role in controlling immune response in dendritic cells, T cells and macrophages (10, 11). Interestingly, the intronic *FOXO3* gene variant rs12212067 was observed to be associated to differential severity of autoimmune diseases, like rheumatoid arthritis and Crohn's diseases (12, 13), and infectious diseases, like malaria and tuberculosis (12, 14, 15). The allele G of this genetic variant was associated to severity to malaria in Kenyan and Vietnamese populations (12), a finding that was later validated in Gabonese population (14). Interestingly, the

[†]Both the authors share senior authorship.

allele G increased FOXO3 mRNA levels compared with the ancestral T allele, resulting in a few inflammatory cytokines (10). In Chagas disease and malaria, the role of proinflammatory cytokines like tumor necrosis factor- α (TNF- α) and interferon- γ (IFN- γ), and regulatory cytokines like interleukin-10 (IL-10) have been described to play an important role in parasite clearance and disease severity based in an equilibrated immune response (16, 17). Taking into account above consideration, the aim of our study was to assess whether FOXO3 gene variant rs12212067 is associated to susceptibility to infection and/or severity of Chagas disease.

In this study we included 1171 individuals from an endemic area of Chagas disease of department of Santander, Colombia. The participants in this work were enrolled in two selection processes: 1) recruitment after a medical visit to the area and 2) patients coming to Fundación Cardiovascular de Colombia, where they were diagnosed with Chagas disease. The population from this region of Colombia is a homogeneous mixture, with no specific concentration of any ethnicity. Additionally, the people living in this region is lower-income, with poor housing sets which favors the parasite transmission via the vector (kissing bug). The individuals coming to the citation underwent the clinical examination as follows: by using enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) and indirect hemagglutination commercial test, 576 individuals were classified as seropositive for *T. cruzi* antigens and 595 were classified as seronegative, using this last group as controls. Both analyses were used in order to avoid a possible false negative in the classification of the individuals. Subsequently, based on the results from clinical evaluation, electrocardiogram, and echocardiogram, 175 seropositive individuals were classified as asymptomatic and 401 individuals were classified as chronic Chagasic cardiomyopathy individuals. All individuals were older than 18 and the mean age of participants was 45.86 years for seronegative individuals, 58.00 for asymptomatic individuals and 63.14 for chronic Chagasic cardiomyopathy patients. Due to the chronicity and late onset of symptoms in Chagas disease, it was expected that mean age of CCC patients were higher than the mean age in the other groups. The sex distribution for the entire group was similar. The Ethics Committees from Universidad Industrial de Santander and Fundación Cardiovascular de Colombia approved this study in accordance with the ethical standards laid down in the 1964 Declaration of Helsinki and written informed consent was obtained from all the subjects prior to participation.

Genomic DNA was isolated from 7 ml of ethylenediaminetetraacetic acid (EDTA) anticoagulated blood samples using standard salting-out techniques. FOXO3 rs12212067 was genotyped using TaqMan allelic discrimination assay (Applied Biosystems, Foster City, CA) on a LightCycler 480 real-time PCR system (Roche Diagnostics, Basel, Switzerland). For all groups of individuals, Hardy–Weinberg equilibrium was determined at significance level of 0.01. Differences between allele and genotype frequencies in individuals were

determined by using chi-squared test. Odds ratios and 95% confidence intervals were calculated according to Woolf's method. We used statistical software package PLINK V1.07 (<http://pngu.mgh.harvard.edu/purcell/plink>) (18) for all analysis. A *P*-value less than 0.05 was considered to be statistically significant. Statistical power of our study was calculated by using Power Calculator for Genetic Studies 2006 (CaTS) software (<http://www.sph.umich.edu/csg/abecasis/CaTS/>) (19).

FOXO3 gene variant rs12212067 was in Hardy–Weinberg equilibrium for the analyzed cohort ($P = 1.00$ in all individuals, $P = 0.75$ in seropositive patients and $P = 0.71$ in seronegative individuals). Genotyping rate success was over 95%. First, in order to evaluate the association between the FOXO3 gene variant rs12212067 and the susceptibility to *T. cruzi* infection, allelic and genotypic frequencies of seronegative and seropositive individuals were compared (Table 1). The frequency of FOXO3 gene variant rs12212067 allele G was slightly lower in seronegative individuals compared with seropositive individuals (5.87% vs 6.99%), but this difference was not statistically significantly different among the groups ($P = 0.2688$).

Next, in order to evaluate the possible association of FOXO3 rs12212067 and chronic Chagasic cardiomyopathy, allelic and genotypic frequencies of asymptomatic and chronic Chagasic cardiomyopathy individuals were compared (Table 1). In this case, the frequency of FOXO3 gene variant rs12212067 allele G was higher in asymptomatic individuals compared with chronic Chagasic cardiomyopathy individuals (7.23% vs 6.89%). However, similar to previous analysis, we observed no statistically significant differences between asymptomatic and cardiomyopathic individuals ($P = 0.8392$, Table 1).

The different mean ages in the groups of individuals may be a confounding factor in our statistical analysis. Due to this, all analyses were performed with logistic regression and age as covariate, confirming the lack of association of the analyzed FOXO3 gene variant with risk of infection and/or disease severity in this cohort (data not shown).

This is the first study in which FOXO3 rs12212067 gene variant is analyzed regarding its role in Chagas disease. Chronic Chagasic cardiomyopathy has been related to parasite persistence on cardiac tissue which leads to an uncontrolled inflammatory response from the immune system, causing damage in neighbor tissues (20–22). In our study, frequency of allele G, involved in major expression of FOXO3 mRNA which causes a lower expression of proinflammatory cytokines, did not show statistical differences among the analyzed groups.

Two possible limitations in our work are the high prevalence of CCC individuals and the lack of information regarding a potential sub-stratification in our set of individuals. We want to remark that the sample set used in this study has been previously used for other analysis (23), and we are confident with its homogeneity. However, for us it would be desirable to increase the number of individuals in order to get more homogeneous groups and to analyze more genetic markers

Table 1 Genotype and allele distribution of FOXO3 rs12212067 polymorphism in seronegative vs seropositive individuals and asymptomatic vs chronic Chagasic cardiomyopathy (CCC) individuals

SNP	1 2	Group (N)	Genotype. N (%)			MAF %	Allele test	
			1 1	1 2	2 2		P	OR (95% CI)
rs12212067	G T	Seronegative (588)	1 (0.17)	67 (11.39)	520 (88.44)	5.87	0.2688	1.21 (0.86–1.68)
		Seropositive (572)	3 (0.52)	74 (12.94)	495 (86.54)	6.99		
		Asymptomatic (173)	2 (1.16)	21 (12.14)	150 (86.71)	7.23		
		CCC (399)	1 (0.25)	53 (13.28)	345 (86.47)	6.89		

CI, confidence interval; OR, odds ratio; SNP, single nucleotide polymorphism; MAF, Minor allele frequency.

which could indicate us if a possible sub-stratification, due to different genetic background, is happening in our analysis.

It is worth nothing that our study has enough statistical power (~66%–90%) to detect a strong association between the analyzed single nucleotide polymorphism (SNP) and the infection by *T. cruzi* considering an odds ratio (OR) = 1.5, however, our study has not high statistical power to detect a weak association considering an OR = 1.1. Furthermore, due to the low number of asymptomatic patients in our set of individuals, our study has a middle-low statistical power (~30%–57%) to detect a possible strong association to chronic Chagasic cardiomyopathy considering an OR = 1.5. For more information see *Supporting Information*, Table S1.

In conclusion, our result suggests that FOXO3 rs12212067 gene variant does not play an important role in susceptibility to *T. cruzi* infection and/or chronic Chagasic cardiomyopathy. Additional studies in larger cohorts are needed in order to confirm this finding.

Acknowledgments

This work is part of Doctoral Thesis 'Estudio de las bases genéticas de la enfermedad de Chagas' of the Biomedicine PhD program of the Universidad de Granada, Spain.

This work was supported by donations through the project no. 1102-633-38974 approved by Departamento Administrativo de Ciencia, Tecnología e Innovación, Colciencias, and Universidad Industrial de Santander, Bucaramanga, Colombia.

We thank to Luis Eduardo Echeverría from Fundación Cardiovascular de Colombia for the care and management of patients.

Conflicts of interest

The authors have declared no conflicting interests.

References

- Chapman SJ, Hill AV. Human genetic susceptibility to infectious disease. *Nat Rev Genet* 2012; **13**: 175–88.
- Chagas disease in Latin America: an epidemiological update based on 2010 estimates. *Wkly Epidemiol Rec* 2015; **90**: 33–43.
- Rassi A Jr, Rassi A, Marin-Neto JA. Chagas disease. *Lancet* 2010; **375**: 1388–402.
- Williams-Blangero S, VandeBerg JL, Blangero J, Correa-Oliveira R. Genetic epidemiology of Chagas disease. *Adv Parasitol* 2011; **75**: 147–67.
- Vasconcelos RH, Montenegro SM, Azevedo EA, Gomes YM, Morais CN. Genetic susceptibility to chronic Chagas disease: an overview of single nucleotide polymorphisms of cytokine genes. *Cytokine* 2012; **59**: 203–8.
- Ayo CM, Dalalio MM, Visentainer JE *et al.* Genetic susceptibility to Chagas disease: an overview about the infection and about the association between disease and the immune response genes. *Biomed Res Int* 2013; **2013**: 284729.
- Cunha-Neto E, Chevillard C. Chagas disease cardiomyopathy: immunopathology and genetics. *Mediators Inflamm* 2014; **2014**: 683230.
- Deng X, Sabino EC, Cunha-Neto E *et al.* Genome wide association study (GWAS) of Chagas cardiomyopathy in *Trypanosoma cruzi* seropositive subjects. *PLoS One* 2013; **8**: e79629.
- Greer EL, Brunet A. FOXO transcription factors in ageing and cancer. *Acta Physiol (Oxf)* 2008; **192**: 19–28.
- Dejean AS, Beisner DR, Ch'en IL *et al.* Transcription factor Foxo3 controls the magnitude of T cell immune responses by modulating the function of dendritic cells. *Nat Immunol* 2009; **10**: 504–13.
- Watkins SK, Hurwitz AA. FOXO3: a master switch for regulating tolerance and immunity in dendritic cells. *Oncoimmunology* 2012; **1**: 252–4.
- Lee JC, Espeli M, Anderson CA *et al.* Human SNP links differential outcomes in inflammatory and infectious disease to a FOXO3-regulated pathway. *Cell* 2013; **155**: 57–69.
- Marlow G, Han DY, Triggs CM, Ferguson LR. Food intolerance: associations with the rs12212067 polymorphism of FOXO3 in Crohn's disease patients in New Zealand. *J Nutrigenet Nutrigenomics* 2015; **8**: 70–80.
- Nguetse CN, Kreamsner PG, Velavan TP. FOXO3A regulatory polymorphism and susceptibility to severe malaria in Gabonese children. *Immunogenetics* 2015; **67**: 67–71.
- Lu Y, Zhu Y, Wang X *et al.* FOXO3 rs12212067: T>G association with active tuberculosis in Han Chinese population. *Inflammation* 2016; **39**: 10–5.
- Junqueira C, Caetano B, Bartholomeu DC *et al.* The endless race between *Trypanosoma cruzi* and host immunity: lessons for and beyond Chagas disease. *Expert Rev Mol Med* 2010; **12**: e29.
- Langhorne J, Albano FR, Hensmann M *et al.* Dendritic cells, pro-inflammatory responses, and antigen presentation in a rodent malaria infection. *Immunol Rev* 2004; **201**: 35–47.

18. Purcell S, Neale B, Todd-Brown K *et al.* PLINK: a tool set for whole-genome association and population-based linkage analyses. *Am J Hum Genet* 2007; **81**: 559–75.
19. Skol AD, Scott LJ, Abecasis GR, Boehnke M. Joint analysis is more efficient than replication-based analysis for two-stage genome-wide association studies. *Nat Genet* 2006; **38**: 209–13.
20. Girones N, Fresno M. Etiology of Chagas disease myocarditis: autoimmunity, parasite persistence, or both? *Trends Parasitol* 2003; **19**: 19–22.
21. Tarleton RL, Zhang L. Chagas disease etiology: autoimmunity or parasite persistence? *Parasitol Today* 1999; **15**: 94–9.
22. Gutierrez FR, Guedes PM, Gazzinelli RT, Silva JS. The role of parasite persistence in pathogenesis of Chagas heart disease. *Parasite Immunol* 2009; **31**: 673–85.
23. Leon Rodriguez DA, Echeverria LE, Gonzalez CI, Martin J. Investigation of the role of IL17A gene variants in Chagas disease. *Genes Immun* 2015; **16**: 536–40.

Supporting Information

The following supporting information is available for this article:

Table S1. Statistical power calculation performed using Power Calculator for Genetic Studies 2006 (CaTS) software (<http://www.sph.umich.edu/csg/abecasis/CaTS/>)

Table S1: Statistical power calculation performed using Power Calculator for Genetic Studies 2006 (CaTS) software (<http://www.sph.umich.edu/csg/abecasis/CaTS/>)

Statistical power calculation				
<i>T. cruzi</i> infection (595/576)*				
MAF	5%	10%	15%	20%
OR = 1.50	66%	90%	97%	99%
OR = 1.25	24%	40%	53%	62%
OR = 1.10	8%	11%	14%	16%
Chronic Chagasic cardiomyopathy (175/401)**				
MAF	5%	10%	15%	20%
OR = 1.50	30%	57%	68%	77%
OR = 1.25	11%	21%	25%	30%
OR = 1.10	6%	7%	8%	9%

The estimation was performed considering a prevalence of 1.44% and different minor allele frequencies from 5% to 20%.

*Analysis performed by using 595 seronegative vs. 576 seropositive individuals.

**Analysis performed by using 175 asymptomatic vs. 401 chronic Chagas cardiomyopathy individuals.

7.4. Evaluation of *VDR* gene polymorphisms in *Trypanosoma cruzi* infection and chronic Chagasic cardiomyopathy

SCIENTIFIC REPORTS

OPEN

Evaluation of *VDR* gene polymorphisms in *Trypanosoma cruzi* infection and chronic Chagasic cardiomyopathy

Daniel A Leon Rodríguez¹, F David Carmona¹, Clara Isabel González^{2,*} & Javier Martín^{1,*}

Received: 05 April 2016
 Accepted: 14 July 2016
 Published: 09 August 2016

Vitamin D is an important modulator of the immune response. It acts over several immune cell types where the Vitamin D receptor (VDR) is expressed. Due to the high relevance of this signaling pathway, several studies have investigated the possible influence of genes involved in the metabolism of Vitamin D and its receptor in different human diseases. Here, we analyzed whether four single-nucleotide polymorphisms of the *VDR* gene (rs731236, rs7975232, rs1544410 and rs2228570) are involved in the susceptibility to infection by *Trypanosoma cruzi* and/or to chronic Chagas cardiomyopathy (CCC) in a Colombian endemic population for this parasite. Our results showed that the rs2228570*A allele is associated with CCC development ($P = 4.46E-03$, $OR = 1.51$). In summary, the data presented in this report suggest that variation within the *VDR* gene may affect the immune response against *T. cruzi*, increasing the probability of cardiac complications in infected individuals.

Vitamin D is an important modulator of the immune system^{1,2}. This molecule is involved in both the innate and adaptive responses acting on a wide spectrum of immune cells, in which the Vitamin D receptor (VDR) is expressed³. VDR is a member of the nuclear receptor superfamily. Binding of this molecule with the activated form of Vitamin D (1,25(OH)₂D₃) causes its dimerization with retinoid X receptor (RXR), which control the transcription of specific genes by interacting with the RNA polymerase II⁴.

Chagas disease represents an infectious condition caused by the flagellated protozoan *Trypanosoma cruzi* that currently affects around 6 million people in Latin America⁵. Although infected people do not usually develop further complications after the acute phase of disease, up to one third will suffer from chronic Chagas cardiomyopathy (CCC) a condition that affects the life quality and could lead to premature death^{6,7}. The exact causes of the differential disease outcomes are largely unknown, but increasing knowledge suggests that immune gene variants could play a relevant role by influencing the adequate inflammatory response against the parasitic invasion^{8–12}. Consistent with this, several members of the inflammatory pathway have been recently associated with risk of infection by *T. cruzi* and/or development of CCC, including genes encoding for HLA class-II molecules (DRB1 and DQB1), the chemokine receptor CCR5, interferon-gamma (IFN- γ), tumor necrosis factor alpha (TNF- α), migration inhibitory factor (MIF), and the interleukins IL-1, IL-12B, IL-17A, IL-18, among others^{13–20}.

Due to the high relevance of Vitamin D and its receptor in the immune homeostasis, several studies have investigated the possible influence of genes involved in their metabolism in the development of autoimmune conditions and infectious diseases^{2,21}. In this regard, some polymorphisms of the *VDR* gene have been reported to be associated with different outcomes in autoimmune and infectious diseases, especially in tuberculosis^{4,21}.

Taking the above into consideration, we aimed to explore for the first time the possible implication of *VDR* genetic variation in Chagas disease susceptibility and clinical manifestation.

Results

The genotype frequencies of the four analyzed *VDR* variants did not deviate from Hardy-Weinberg equilibrium in the different subsets ($P > 0.01$), and their genotyping success rate was over 95%. The statistical power of this study is detailed in Table 1. The SNPs rs731236, rs7975232 and rs1544410 showed a relatively high LD in our study

¹Instituto de Parasitología y Biomedicina López-Neyra, IPBLN-CSIC, P.T.S, Granada, Spain. ²Grupo de Inmunología y Epidemiología Molecular, GIEM, Facultad de Salud, Universidad Industrial de Santander, Bucaramanga, Colombia.

*These authors jointly supervised this work. Correspondence and requests for materials should be addressed to J.M. (email: martin@ipb.csic.es)

Statistical power calculation		
	<i>T. cruzi</i> infection (436/547)*	Chronic Chagasic cardiomyopathy (171/376)**
OR = 1.50	98%	82%
OR = 1.25	60%	35%
OR = 1.10	16%	10%

Table 1. Statistical power calculation of our study considering three different OR. The estimation was performed considering a prevalence of 1.44% and a minor allele frequency of 25%. *Analysis performed by using 436 seronegative vs. 547 seropositive individuals. **Analysis performed by using 171 asymptomatic vs. 376 chronic Chagas cardiomyopathy individuals.

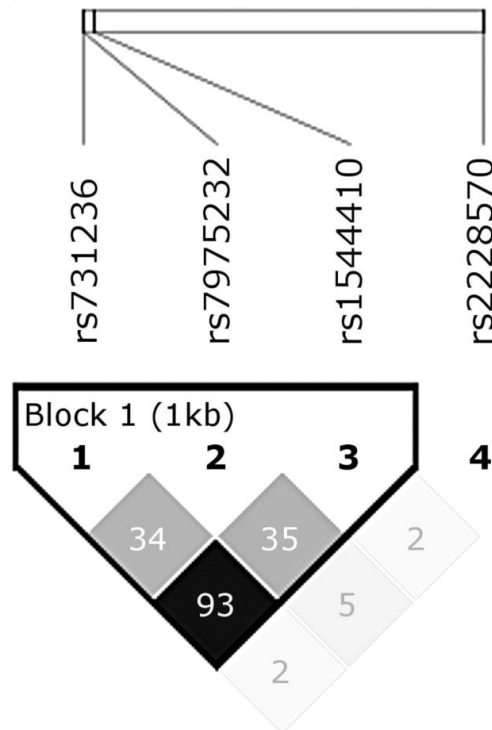


Figure 1. R-Squared plot of analyzed VDR gene variants estimated by using expectation-maximization algorithm in Haploview V4.2.

population (Fig. 1). Particularly, rs731236 and rs1544410 had an r^2 value = 0.93. On the contrary, rs2228570 had an r^2 value < 0.10 with the other SNPs.

First, to analyze the possible implication of the *VDR* polymorphisms in the susceptibility to infection by *T. cruzi*, the allelic and genotypic frequencies of seronegative and seropositive individuals were compared (Table 2). No statistical significance was observed for rs731236, rs7975232 and rs1544410, indicating that these variants may not influence the risk of infection by *T. cruzi* in the studied population. On the other hand, the allele frequencies of rs2228570 differed significantly between the seronegative and seropositive groups ($P = 0.0287$, $OR = 0.81$, $95\% \text{ CI} = 0.67 - 0.98$). The minor allele rs2228570*A was overrepresented in the seronegative subset (45.41% vs. 39.94%), suggesting a possible protective effect of this variant against infection by *T. cruzi*. However, the statistical significance was lost after correction for multiple testing ($P = 0.1147$).

Next, we evaluated the possible association between the *VDR* SNPs and the susceptibility to develop CCC. For that, we compared the allelic and genotypic frequencies of asymptomatic and CCC patients (Table 3). Similar to that observed in the previous analysis, no differences in the allele frequencies of both subgroups of patients

SNP	I 2	Group (N)	Genotype, N (%)			MAF %	Allele test/Age		
			I 1	I 2	2 2		P	P _{FDR}	OR [95% CI]
rs731236	G A	Seronegative (435)	42 (9.66)	166 (38.16)	227 (52.18)	28.74			
		Seropositive (545)	43 (7.89)	228 (41.83)	274 (50.28)	28.81	0.9024	0.9024	1.01 [0.83–1.24]
rs7975232	C A	Seronegative (436)	96 (22.02)	233 (53.44)	107 (24.54)	48.74			
		Seropositive (532)	97 (18.23)	291 (54.70)	144 (27.07)	45.58	0.2206	0.4412	0.88 [0.72–1.08]
rs1544410	T C	Seronegative (434)	39 (8.99)	166 (38.25)	229 (52.76)	28.11			
		Seropositive (535)	43 (8.04)	227 (42.43)	265 (49.53)	29.25	0.4677	0.6236	1.08 [0.88–1.33]
rs2228570	A G	Seronegative (436)	89 (20.41)	218 (50.00)	129 (29.59)	45.41			
		Seropositive (542)	83 (15.31)	267 (49.26)	192 (35.42)	39.94	0.0287	0.1147	0.81 [0.67–0.98]

Table 2. Logistic regression analysis of VDR polymorphisms in seronegative and seropositive individuals including age as covariate.

SNP	I 2	Group (N)	Genotype, N (%)			MAF %	Allele test/Age		
			I 1	I 2	2 2		P	P _{FDR}	OR [95% CI]
rs731236	G A	Asymptomatic (170)	17 (10.00)	69 (40.59)	84 (49.41)	30.29			
		CCC (375)	26 (6.93)	159 (42.40)	190 (50.67)	28.13	0.4406	0.4633	0.89 [0.67–1.19]
rs7975232	C A	Asymptomatic (164)	28 (17.07)	88 (53.66)	48 (29.27)	43.90			
		CCC (368)	69 (18.75)	203 (55.16)	96 (26.09)	46.33	0.4304	0.4633	1.12 [0.84–1.49]
rs1544410	T C	Asymptomatic (168)	16 (9.52)	72 (42.86)	80 (47.62)	30.95			
		CCC (367)	27 (7.36)	155 (42.23)	185 (50.41)	28.47	0.4633	0.4633	0.90 [0.67–1.20]
rs2228570	A G	Asymptomatic (170)	21 (12.35)	75 (44.12)	74 (43.53)	34.41			
		CCC (372)	69 (16.67)	192 (51.61)	118 (31.72)	42.47	4.46E-03	0.0178	1.51 [1.14–2.00]

Table 3. Logistic regression analysis of VDR polymorphisms in asymptomatic and chronic Chagas cardiomyopathy (CCC) individuals, including age as covariate.

were observed for the analyzed SNPs except for rs2228570 ($P = 4.46E-03$, $OR = 1.51$, $95\% CI = 1.14-2.00$). This association was maintained after controlling for multiple testing ($P = 0.0178$). In this case, the frequency of the rs2228570*A allele was reduced in the asymptomatic patients (34.41% vs. 42.47%), suggesting a putative protective role of this variant against CCC development.

On the other hand, a possible haplotypic effect of the studied VDR SNPs was also tested. Due to the high LD in this population (Fig. 1), only three haplotypes were observed in the studied individuals (rs731236|rs7975232|rs1544410: ACC, GAT and AAC). No evidence of association was observed for any haplotype in the different tests performed (seronegative vs. seropositive and asymptomatic vs. CCC, data not shown).

Discussion

In this study, four genetic variants of the VDR gene were tested for association with risk of infection by *T. cruzi* and/or development of CCC in a population from a Colombian endemic region of Chagas disease. Our data provides strong evidence that the VDR SNP rs2228570 is associated with CCC in infected individuals, as the odds of having the minor allele was significantly increased in symptomatic individuals as compared to asymptomatic patients. This polymorphism is located at the 5' end of the VDR coding sequence. It has been reported that the presence of the minor allele originates an alternative starting transcription site, which leads to a longer isoform with a reduced transcription activity. Therefore, it has been proposed that the rs2228570 variant may affect the responsiveness to vitamin D^{22,23}.

Vitamin D is a key molecule of the immune system. The active form of this compound seems to potentiate phagocytosis by macrophages and the production of antimicrobial peptides^{1,2}. Additionally, it has been observed that it shifts the immune response from TH1/TH17 towards TH2 by inhibiting the production of IFN- γ , IL-12, IL-17, and IL-21, among other cytokines². In Chagas disease, the infection by *T. cruzi* causes a coordinated immune response. That is, in the first line of defense, the innate response is initiated by dendritic cells and macrophages, which produce IL-12 and TNF- α after recognizing the parasite. These cytokines activate natural killer cells that, in turn, enhance the production on IFN- γ . As a consequence, the parasite clearance is facilitated by shifting to a TH1 dominant response that controls the infection³. Hence, proinflammatory cytokines, such as IFN- γ , IL-12, IL-17 and TNF- α , are essential for controlling the parasite²⁴⁻²⁸. In addition, several studies have suggested that the persistence of *T. cruzi* in the organism is directly related to the development of severe complications in Chagas disease²⁹⁻³¹. Our results are in agreement with the hypothesis that a stronger immune response may protect patients against the persistence of the parasite. Our data showed that the rs2228570*A allele, which allows the transcription of the enlarged VDR isoform, is more prevalent in CCC patients compared with asymptomatic individuals. We speculate that vitamin D could influence the inflammatory response against *T. cruzi* by downregulating the expression of pro-inflammatory cytokines such as IFN- γ , IL-12 and IL-17. As a consequence, the parasitic persistence could be favored thus increasing the predisposition to develop cardiac complications

in Chagas patients. The analysis of vitamin D profiles in individuals exposed to *T. cruzi* infection with different degrees of cardiac involvement would shed light into this idea.

On the other hand, the frequency of the VDR allele rs2228570*A was increased in the seronegative group compared to the seropositive one. In principle, this may be contradictory to the above, as a more potent innate response should lead to a quicker clearance of the parasite in infected individuals before the production of antibodies. However, the statistical significance of this result was lost after correction for multiple testing, which indicates a lack of consistency of this putative association. Further analyses in larger populations are required to clarify this issue.

The role of vitamin D in other protozoan infections is not clear. In malaria, for instance, two different studies indicated that this molecule plays an important role in the control of the immune pathogenesis and cerebral malaria^{32–34}. Vitamin D was observed to reduce the risk of cerebral malaria in mice, thus suggesting that it may attenuate the inflammatory response leading to an increase of survival rates³². However, evidences also point to vitamin D deficiency as directly responsible for severe cerebral malaria in children coming from Uganda³³. To our knowledge, only one study has evaluated the possible association between VDR genetic variation and malaria. Specifically, two VDR SNPs, rs731236 and rs1544410, were shown to affect gametocytemia levels in individuals infected with *Plasmodium vivax*³⁴. In Leishmania, two different studies indicated that suppression of both vitamin D and VDR in mice favor the parasite eradication in a TH1 dependent manner^{35,36}, supporting our hypothesis that vitamin D likely promotes parasite clearance in Chagas.

Regarding the study of VDR gene polymorphisms in other infectious diseases, rs2228570 has been associated with tuberculosis in populations of different ethnicities, although the results are contradictory. For instance, a meta-analysis and a case/control study showed that the rs2228570*A allele conferred risk to this condition in Chinese and Iranian patients, respectively^{37,38}. However, other studies reported associations of this same allele with protection against pulmonary tuberculosis in a Moroccan population³⁹. VDR rs2228570 has been evaluated also in leprosy, an infectious disease caused by another species of *Mycobacterium*. In this case, homozygosity of rs2228570*A was associated with a higher risk to develop leprosy in an Indian population⁴⁰.

Thus, it seems clear that the vitamin D signaling has a major role in the immune response against different infectious diseases, and this has led to propose that controlling the uptake and metabolic status of vitamin D may be useful to improve the current therapeutic strategies in these conditions^{1,41}. Consequently, future studies aimed to analyze the levels of vitamin D in the different groups of individuals included in this study, could represent an important step forward towards the understanding of Chagas disease development and treatment. Replication of the genetic results reported here in larger independent cohorts would be also desirable to confirm our findings.

In conclusion, we have observed a genetic association between the VDR gene polymorphism rs2228570 and risk to develop CCC in Chagas patients. Although this association has a clear functional implication, more powered studies and functional experiments are needed to definitively confirm the involvement of the vitamin D signaling in the development of this severe complication after infection by *T. cruzi*.

Material and Methods

Study subjects. For this study, 1,172 individuals from the endemic regions for *T. cruzi* Guanentina and Comunera at the Santander Department, Colombia (localized between 5°26' and 8°08' north and 72°26' and 74°32' west) (Supplementary Figure S1) were enrolled. These provinces are located on the north-east side of the country, and their population is a homogeneous mix with no specific concentration of any ethnicity. Regarding the selection criteria, participants were recruited either after a medical visit to the endemic area or after attending to "Fundación Cardiovascular de Colombia", a medical institution specialized in cardiovascular disorders situated in the city of Floridablanca (Supplementary Figure S1), where they were diagnosed with Chagas disease. Almost all invited individuals agreed to participate in this study. Since Chagas disease is a chronic disorder in which symptoms may appear after several years of infection^{7,8}, we decided to exclude those individuals younger than 30 years old (189 in total) in order to perform a more consistent analysis of possible resistance to the infection (as the selected individuals had a longer time of exposure to vectorial infection). In total, 983 individuals were finally included in the analyses. Then, the individuals were classified as seronegative or seropositive (n = 436 and 547, respectively) for *T. cruzi* antigens accordingly to two different commercial immunological tests, the enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) (BioELISA Chagas, Biokit, Lliçà d'Amunt, Barcelona, Spain) and indirect hemagglutination (Chagatest IHA, Wiener Lab, Rosario, Argentina). All seronegative individuals were negative for both tests. Seropositive patients underwent an exhaustive clinical evaluation and were subsequently subdivided into asymptomatic and chronic Chagas cardiomyopathy (CCC) patients (n = 171 and 376, respectively) based on electrocardiogram and echocardiogram information. This classification is based in the guidelines from the World Health Organization (WHO) (<http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs340/en/>), the Pan-American Health Organization (PAHO) (http://www.paho.org/hq/index.php?option=com_topics&view=article&id=10&Itemid=40743), and the classification established by the international consensus of Buenos Aires of 2010 (<http://www.fac.org.ar/7cvc/llave/c016/mordinio.pdf>). The mean age of participants was 52.11 years for seronegative individuals, 56.67 for asymptomatic individuals and 62.66 for CCC patients. The sex distribution for the entire group was 55% female and 45% male.

Ethics statement. All participants signed an informed consent. This study was approved by the Act No. 15 of 2005 by the Ethics Committees from "Universidad Industrial de Santander" and "Fundación Cardiovascular de Colombia" in accordance with the ethical standards laid down in the 1964 Declaration of Helsinki.

SNP selection. Following a candidate gene strategy, four single-nucleotide polymorphisms (SNPs) of the VDR gene, previously described to have a functional implication on gene expression and function, were selected for this study^{22,23,42,43}. These variants include rs731236 (TaqI), rs7975232 (ApaI), rs1544410 (BsmI), and

rs2228570 (Fok1). The three first SNPs have been related to a differential expression of VDR in different cells, whereas the latter represents a cytosine to thymine change in an ACG codon, which creates an alternative start site that produces a longer VDR protein with a reduced transcriptional activity^{22,23,42,43}.

DNA extraction and Genotyping. Genomic DNA was isolated from 5–10 ml of EDTA anticoagulated blood samples using standard salting-out techniques as previously described⁴⁴. The four SNPs were genotyped using TaqMan allelic discrimination assays from Applied Biosystems (Foster City, California, USA; catalog numbers: C_2404008_10, C_28977635_10, C_8716062_10, C_12060045_20). The genotyping was performed on a LightCycler 480 real-time PCR system (Roche Diagnostics, Basel, Switzerland).

Statistical analysis. All the statistical analyses were performed with the statistical software package Plink V1.07 (<http://pngu.mgh.harvard.edu/purcell/plink/>)⁴⁵. For all groups of individuals, possible deviation from Hardy-Weinberg equilibrium was determined in every SNP at the 1% significance level. To test for possible allelic and genotypic associations with disease susceptibility and clinical complications, we compared the allelic, genotypic and haplotypic frequencies of the VDR variants between seronegative vs. seropositive individuals and asymptomatic vs. CCC individuals by logistic regression assuming an additive model and using age as covariate (as in Chagas disease symptoms may appear many years after infection). The Benjamini & Hochberg step-up false discovery rate (FDR) correction was used in all analyses to control for possible multiple testing effects. Odds ratios (OR) and 95% confidence intervals (CI) were calculated according to Woolf's method. P-values lower than 0.05 were considered as statistically significant. Pairwise linkage disequilibrium (LD) (D' and r^2) and haplotypic blocks were estimated using an expectation-maximization algorithm as implemented in Haploview v4.2⁴⁶. The statistical power of our study was calculated with the Power Calculator for Genetic Studies 2006 (CaTS) software (<http://www.sph.umich.edu/csg/abecasis/CaTS/>)⁴⁷.

References

- Baekke, F., Takiishi, T., Korfi, H., Gysemans, C. & Mathieu, C. Vitamin D: modulator of the immune system. *Current opinion in pharmacology* **10**, 482–496, doi: 10.1016/j.coph.2010.04.001 (2010).
- Van Belle, T. L., Gysemans, C. & Mathieu, C. Vitamin D in autoimmune, infectious and allergic diseases: a vital player? *Best practice & research. Clinical endocrinology & metabolism* **25**, 617–632, doi: 10.1016/j.beem.2011.04.009 (2011).
- Wang, Y., Zhu, J. & DeLuca, H. F. Where is the vitamin D receptor? *Archives of biochemistry and biophysics* **523**, 123–133, doi: 10.1016/j.abb.2012.04.001 (2012).
- Hausser, M. R. *et al.* The nuclear vitamin D receptor: biological and molecular regulatory properties revealed. *Journal of bone and mineral research: the official journal of the American Society for Bone and Mineral Research* **13**, 325–349, doi: 10.1359/jbmr.1998.13.3.325 (1998).
- Chagas disease in Latin America: an epidemiological update based on 2010 estimates. *Releve epidemiologique hebdomadaire/Section d'hygiene du Secretariat de la Societe des Nations = Weekly epidemiological record/Health Section of the Secretariat of the League of Nations* **90**, 33–43 (2015).
- Rassi, A. Jr., Rassi, A. & Marin-Neto, J. A. Chagas disease. *Lancet* **375**, 1388–1402, doi: 10.1016/S0140-6736(10)60061-X (2010).
- Bern, C. Chagas' Disease. *The New England journal of medicine* **373**, 456–466, doi: 10.1056/NEJMr1410150 (2015).
- Junqueira, C. *et al.* The endless race between *Trypanosoma cruzi* and host immunity: lessons for and beyond Chagas disease. *Expert reviews in molecular medicine* **12**, e29, doi: 10.1017/S1462399410001560 (2010).
- Andrade, D. V., Gollob, K. J. & Dutra, W. O. Acute chagas disease: new global challenges for an old neglected disease. *PLoS neglected tropical diseases* **8**, e3010, doi: 10.1371/journal.pntd.0003010 (2014).
- Vasconcelos, R. H., Montenegro, S. M., Azevedo, E. A., Gomes, Y. M. & Morais, C. N. Genetic susceptibility to chronic Chagas disease: an overview of single nucleotide polymorphisms of cytokine genes. *Cytokine* **59**, 203–208, doi: 10.1016/j.cyto.2012.04.035 (2012).
- Ayo, C. M. *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**, 284729, doi: 10.1155/2013/284729 (2013).
- Cunha-Neto, E. & Chevillard, C. Chagas disease cardiomyopathy: immunopathology and genetics. *Mediators of inflammation* **2014**, 683230, doi: 10.1155/2014/683230 (2014).
- Nieto, A. *et al.* HLA haplotypes are associated with differential susceptibility to *Trypanosoma cruzi* infection. *Tissue antigens* **55**, 195–198 (2000).
- Calzada, J. E., Nieto, A., Beraun, Y. & Martin, J. Chemokine receptor CCR5 polymorphisms and Chagas' disease cardiomyopathy. *Tissue antigens* **58**, 154–158 (2001).
- Florez, O., Zafra, G., Morillo, C., Martin, J. & Gonzalez, C. I. Interleukin-1 gene cluster polymorphism in chagas disease in a Colombian case-control study. *Human immunology* **67**, 741–748, doi: 10.1016/j.humimm.2006.06.004 (2006).
- Zafra, G., Morillo, C., Martin, J., Gonzalez, A. & Gonzalez, C. I. Polymorphism in the 3' UTR of the IL12B gene is associated with Chagas' disease cardiomyopathy. *Microbes and infection/Institut Pasteur* **9**, 1049–1052, doi: 10.1016/j.micinf.2007.04.010 (2007).
- Torres, O. A. *et al.* Role of the IFNG +874T/A polymorphism in Chagas disease in a Colombian population. *Infection, genetics and evolution: journal of molecular epidemiology and evolutionary genetics in infectious diseases* **10**, 682–685, doi: 10.1016/j.meegid.2010.03.009 (2010).
- Criado, L., Florez, O., Martin, J. & Gonzalez, C. I. Genetic polymorphisms in TNFA/TNFR2 genes and Chagas disease in a Colombian endemic population. *Cytokine* **57**, 398–401, doi: 10.1016/j.cyto.2011.12.007 (2012).
- Leon Rodriguez, D. A., Echeverria, L. E., Gonzalez, C. I. & Martin, J. Investigation of the role of IL17A gene variants in Chagas disease. *Genes and immunity* **16**, 536–540, doi: 10.1038/gene.2015.42 (2015).
- Machuca, M. A., Suarez, E. U., Echeverria, L. E., Martin, J. & Gonzalez, C. I. SNP/haplotype associations of CCR2 and CCR5 genes with severity of chagasic cardiomyopathy. *Human immunology* **75**, 1210–1215, doi: 10.1016/j.humimm.2014.09.023 (2014).
- Adams, J. S., Liu, P. T., Chun, R., Modlin, R. L. & Hewison, M. Vitamin D in defense of the human immune response. *Annals of the New York Academy of Sciences* **1117**, 94–105, doi: 10.1196/annals.1402.036 (2007).
- Saijo, T. *et al.* A unique mutation in the vitamin D receptor gene in three Japanese patients with vitamin D-dependent rickets type II: utility of single-strand conformation polymorphism analysis for heterozygous carrier detection. *American journal of human genetics* **49**, 668–673 (1991).
- Arai, H. *et al.* A vitamin D receptor gene polymorphism in the translation initiation codon: effect on protein activity and relation to bone mineral density in Japanese women. *Journal of bone and mineral research: the official journal of the American Society for Bone and Mineral Research* **12**, 915–921, doi: 10.1359/jbmr.1997.12.6.915 (1997).
- Hunter, C. A., Slifer, T. & Araujo, F. Interleukin-12-mediated resistance to *Trypanosoma cruzi* is dependent on tumor necrosis factor alpha and gamma interferon. *Infection and immunity* **64**, 2381–2386 (1996).

25. Holscher, C. *et al.* Defective nitric oxide effector functions lead to extreme susceptibility of *Trypanosoma cruzi*-infected mice deficient in gamma interferon receptor or inducible nitric oxide synthase. *Infection and immunity* **66**, 1208–1215 (1998).
26. da Matta Guedes, P. M. *et al.* IL-17 produced during *Trypanosoma cruzi* infection plays a central role in regulating parasite-induced myocarditis. *PLoS neglected tropical diseases* **4**, e604, doi: 10.1371/journal.pntd.0000604 (2010).
27. Miyazaki, Y. *et al.* IL-17 is necessary for host protection against acute-phase *Trypanosoma cruzi* infection. *J Immunol* **185**, 1150–1157, doi: 10.4049/jimmunol.0900047 (2010).
28. Pissetti, C. W. *et al.* Genetic and functional role of TNF-alpha in the development *Trypanosoma cruzi* infection. *PLoS neglected tropical diseases* **5**, e976, doi: 10.1371/journal.pntd.0000976 (2011).
29. Girones, N. & Fresno, M. Etiology of Chagas disease myocarditis: autoimmunity, parasite persistence, or both? *Trends in parasitology* **19**, 19–22 (2003).
30. Gutierrez, F. R., Guedes, P. M., Gazzinelli, R. T. & Silva, J. S. The role of parasite persistence in pathogenesis of Chagas heart disease. *Parasite immunology* **31**, 673–685, doi: 10.1111/j.1365-3024.2009.01108.x (2009).
31. Higuchi Mde, L., Benvenuti, L. A., Martins Reis, M. & Metzger, M. Pathophysiology of the heart in Chagas' disease: current status and new developments. *Cardiovascular research* **60**, 96–107 (2003).
32. He, X. *et al.* Vitamin D inhibits the occurrence of experimental cerebral malaria in mice by suppressing the host inflammatory response. *J Immunol* **193**, 1314–1323, doi: 10.4049/jimmunol.1400089 (2014).
33. Cusick, S. E., Opoka, R. O., Lund, T. C., John, C. C. & Polgreen, L. E. Vitamin D insufficiency is common in Ugandan children and is associated with severe malaria. *PLoS one* **9**, e113185, doi: 10.1371/journal.pone.0113185 (2014).
34. Sortica, V. A. *et al.* Role of IL6, IL12B and VDR gene polymorphisms in *Plasmodium vivax* malaria severity, parasitemia and gametocytemia levels in an Amazonian Brazilian population. *Cytokine* **65**, 42–47, doi: 10.1016/j.cyto.2013.09.014 (2014).
35. Ehrchen, J. *et al.* Vitamin D receptor signaling contributes to susceptibility to infection with *Leishmania major*. *FASEB journal: official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology* **21**, 3208–3218, doi: 10.1096/fj.06-7261.com (2007).
36. Whitcomb, J. P. *et al.* The Role of Vitamin D and Vitamin D Receptor in Immunity to *Leishmania major* Infection. *Journal of parasitology research* **2012**, 134645, doi: 10.1155/2012/134645 (2012).
37. Chen, C., Liu, Q., Zhu, L., Yang, H. & Lu, W. Vitamin D receptor gene polymorphisms on the risk of tuberculosis, a meta-analysis of 29 case-control studies. *PLoS one* **8**, e83843, doi: 10.1371/journal.pone.0083843 (2013).
38. Salimi, S., Farajian-Mashhadi, F., Alavi-Naini, R., Talebian, G. & Naroie-Nejad, M. Association between vitamin D receptor polymorphisms and haplotypes with pulmonary tuberculosis. *Biomedical reports* **3**, 189–194, doi: 10.3892/br.2014.402 (2015).
39. Arji, N. *et al.* Genetic diversity of TLR2, TLR4, and VDR loci and pulmonary tuberculosis in Moroccan patients. *Journal of infection in developing countries* **8**, 430–440, doi: 10.3855/jidc.3820 (2014).
40. Neela, V. S. *et al.* Association of Taq I, Fok I and Apa I polymorphisms in Vitamin D Receptor (VDR) gene with leprosy. *Human immunology* **76**, 402–405, doi: 10.1016/j.humimm.2015.04.002 (2015).
41. Korf, H., Decalonne, B. & Mathieu, C. Vitamin D for infections. *Current opinion in endocrinology, diabetes, and obesity* **21**, 431–436, doi: 10.1097/MED.0000000000000108 (2014).
42. Ma, J. *et al.* Vitamin D receptor polymorphisms, circulating vitamin D metabolites, and risk of prostate cancer in United States physicians. *Cancer epidemiology, biomarkers & prevention: a publication of the American Association for Cancer Research, cosponsored by the American Society of Preventive Oncology* **7**, 385–390 (1998).
43. Morrison, N. A. *et al.* Prediction of bone density from vitamin D receptor alleles. *Nature* **367**, 284–287, doi: 10.1038/367284a0 (1994).
44. Miller, S. A., Dykes, D. D. & Polesky, H. F. A simple salting out procedure for extracting DNA from human nucleated cells. *Nucleic Acids Res* **16**, 1215 (1988).
45. Purcell, S. *et al.* PLINK: a tool set for whole-genome association and population-based linkage analyses. *American journal of human genetics* **81**, 559–575, doi: 10.1086/519795 (2007).
46. Barrett, J. C., Fry, B., Maller, J. & Daly, M. J. Haploview: analysis and visualization of LD and haplotype maps. *Bioinformatics* **21**, 263–265, doi: 10.1093/bioinformatics/bth457 (2005).
47. Skol, A. D., Scott, L. J., Abecasis, G. R. & Boehnke, M. Joint analysis is more efficient than replication-based analysis for two-stage genome-wide association studies. *Nature genetics* **38**, 209–213, doi: 10.1038/ng1706 (2006).

Acknowledgements

This work is part of Doctoral Thesis “Estudio de las bases genéticas de la enfermedad de Chagas” of the Biomedicine PhD program of the Universidad de Granada, Spain. This work was supported by donations through the project no. 1102-633-38974 approved by Departamento Administrativo de Ciencia, Tecnología e Innovación, Colciencias, and Universidad Industrial de Santander, Bucaramanga, Colombia. We thank to Luis Eduardo Echeverría (from the Fundación Cardiovascular de Colombia Floridablanca, Santander, Colombia) for the care and management of patients, Sofia Vargas, Sonia García and Gema Robledo (from the Instituto de Parasitología y Biomedicina ‘López-Neyra’, CSIC, Spain) for their excellent technical assistance and all of the patients and healthy controls for kindly providing their essential collaboration.

Author Contributions

D.A.L.R. made the experiments; D.A.L.R. and F.D.C. performed the statistical analyses; D.A.L.R. and F.D.C. wrote the manuscript; C.I.G. and J.M. reviewed the manuscript.

Additional Information

Supplementary information accompanies this paper at <http://www.nature.com/srep>

Competing financial interests: The authors declare no competing financial interests.

How to cite this article: Leon Rodriguez D. A. *et al.* Evaluation of VDR gene polymorphisms in *Trypanosoma cruzi* infection and chronic Chagasic cardiomyopathy. *Sci. Rep.* **6**, 31263; doi: 10.1038/srep31263 (2016).



This work is licensed under a Creative Commons Attribution 4.0 International License. The images or other third party material in this article are included in the article's Creative Commons license, unless indicated otherwise in the credit line; if the material is not included under the Creative Commons license, users will need to obtain permission from the license holder to reproduce the material. To view a copy of this license, visit <http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>

© The Author(s) 2016

7.5. Analysis of *TYK2* gene variants in the susceptibility to Chagas Disease



1

2

3 **Analysis of *TYK2* gene variants in the susceptibility to**

4 **Chagas Disease**

5

6

7 Daniel A Leon Rodriguez¹, F David Carmona¹, Luis Eduardo Echeverría², Clara Isabel

8 González^{3†} and Javier Martin^{1†*}

9

10 ¹Instituto de Parasitología y Biomedicina López-Neyra, IPBLN-CSIC, P.T.S., Granada,

11 Spain

12 ²Clínica de Falla Cardíaca y Trasplante. Fundación Cardiovascular de Colombia.

13 Floridablanca, Santander, Colombia.

14 ³Grupo de Inmunología y Epidemiología Molecular, GIEM, Facultad de Salud,

15 Universidad Industrial de Santander, Bucaramanga, Colombia

16

17

18 *Corresponding author: Javier Martin, Instituto de Parasitología y Biomedicina López-

19 Neyra, IPBLN-CSIC, P.T. Ciencias de la Salud, Avenida del Conocimiento s/n 18016,

20 Armilla, Granada, Spain; email: martin@ipb.csic.es

21

22 † CIG & JM share senior authorship

23

24

25 **Abstract**

26

27 Tyrosine kinase 2 (TYK2) is a member of the Janus kinases family implicated in the
28 signal transduction of type I interferons and several interleukins. It has been described
29 that genetic mutations within *TYK2* lead to multiple deleterious effects in the immune
30 response and to an increased susceptibility to microorganisms. In this work, we
31 investigated the possible influence of three *TYK2* non-synonymous polymorphisms
32 (rs34536443, rs12720356 and rs2304256) in the susceptibility to infection by
33 *Trypanosoma cruzi* and/or the development of Chagas cardiomyopathy in the
34 Colombian population. Our results suggest that *TYK2* could be involved in the
35 immunopathological mechanisms underlying the severity of Chagas disease, as the A/A
36 genotype of the rs2304256 variant was associated with protection against chronic
37 chagasic cardiomyopathy ($P = 0.0114$, $P_{\text{FDR}} = 0.0343$, $\text{OR} = 0.32$, $95\% \text{ CI} = 0.13-0.77$).

38

39

40 **Introduction**

41

42 According to last estimations, 6 million people in Latin America suffer from Chagas
43 disease, a disorder caused by the infection with the protozoan parasite *Trypanosoma*
44 *cruzi* [1]. Chagas disease has two clearly identified stages, *i.e.* the early acute phase and
45 the later chronic phase. The first one is characterized by the appearance of symptoms
46 like fever, headache and/or swollen lymph nodes, which disappear after several weeks.
47 Then, infected individuals enter the chronic phase of the disease with an absence of
48 symptoms in most cases. However, around 30% of infected people develop cardiac
49 and/or digestive complications [2]. The causes of this differential susceptibility to
50 develop cardiac and/or digestive problems are unknown, but it is believed that host
51 genetic factor could be implicated, as it has been observed in other infectious diseases
52 [3]. During the last years, several studies have been carried out in Chagas endemic
53 populations, reporting evidences of a genetic component influencing the susceptibility
54 to infection by *T. cruzi* and/or chronic Chagas cardiomyopathy [4].

55

56 Immune response to *T. cruzi* starts immediately after infection. First, the innate immune
57 system has an important role in controlling replication and spread of the parasite in the
58 host tissues. In this phase, several cytokines including Interleukin 12 (IL-12), Tumor
59 necrosis factor alpha (TNF- α), Interferon gamma (IFN- γ) and reactive nitrogen species,
60 regulate parasite invasion. Subsequently, an adaptive response characterized by a strong
61 and persistent Th1 response dependent of IL-12 takes place, which facilitate the parasite
62 clearing in the host [5]. Interestingly, previous studies have described that genetic
63 polymorphisms of *IL12B*, *TNFA* and *IFNG* genes are associated to differential severity

64 of the disease in a Colombian endemic population, indicating a possible implication of
65 this pathway in the susceptibility to chronic Chagasic cardiomyopathy [6-8].

66

67 The tyrosine kinase 2 (*TYK2*) gene encodes a member of the Janus kinases (JAK)
68 family that seems to be essential for signal transduction of type I interferons, and the
69 interleukins (IL) IL-6, IL-10, IL-12 and IL-13 [9]. Knockout mice for *TYK2* displayed
70 reduced responsiveness to type I interferons, lowered production of IFN- γ in spleen
71 cells after treatment with IL-12 and IL-18, altered production of NO, increased
72 susceptibility to viral infection, and altered differentiation into Th1 cells from naïve
73 helper T cells [10-12]. In humans, patients with genetic mutations on *TYK2* exhibited
74 multiple deleterious effects in the immune response, including impaired responses to
75 IL-12 and type I interferons, increased susceptibility to microorganisms (Virus, fungi
76 and mycobacteria) and an imbalanced Th1/Th2 differentiation [13, 14].

77

78 Based on all the above, we decided to perform a genetic analysis of the *TYK2* gene in
79 order to evaluate its possible influence in the susceptibility to infection by *T. cruzi*
80 and/or the development of Chagas cardiomyopathy.

81

82 **Materials and Methods**

83

84 **Study subjects**

85

86 For this study, 983 Colombian individuals from the endemic area of Santander State,
87 Colombia, were enrolled. According to the National Health Institute of Colombia, the
88 prevalence of Chagas disease in this region is between 1.44% and 2.50%, and it is
89 estimated that 8 million people are in risk of being infected by the parasite. Individuals
90 enrolled in this study were selected either after a medical visit to endemic area by the
91 local hospitals or after a visit to the "Fundación Cardiovascular de Colombia". All
92 participants were over 30 years old and did not belong to any specific ethnic group. In
93 this regard, the population of this region of Colombia is mainly composed of mestizo
94 individuals, without any specific ancestry. However, analysis of ancestry-informative
95 markers was not performed and, hence, a possible influence of population sub-
96 stratification as confounding factor may not be discarded.

97

98 First, the study group was classified according to the results of two serological tests
99 (enzyme-linked immunosorbent assay and a commercial indirect hemagglutination test)
100 as seropositive individuals (n=547) and seronegative individuals (n=436), using this last
101 subgroup as controls. The seropositive individuals were clinically evaluated by
102 electrocardiograms and echocardiograms and subdivided into asymptomatic individuals
103 (n=171), and chronic Chagas cardiomyopathy patients (n=376). Finally, the chronic
104 Chagas cardiomyopathy patients were also classified based on the degree of cardiac
105 involvement as follows: CII (n= 158, radiology indicative of light heart hypertrophy or

106 minor ECG alterations), CIII (n=188, moderate heart hypertrophy and considerable
107 ECG alterations, mainly conduction abnormalities) and CIV (n=30, severe
108 cardiomegaly and marked ECG alterations, predominantly frequent and/or complex
109 forms of ventricular arrhythmia). The mean age of participants was 52.11 years for
110 seronegative individuals, 56.67 for asymptomatic individuals and 62.66 for chronic
111 Chagas cardiomyopathy patients. The sex distribution for the entire group was 55%
112 female and 45% male.

113

114 **Ethics statement**

115

116 The Ethics Committees from the Universidad Industrial de Santander and Fundación
117 Cardiovascular de Colombia approved this study in accordance with the ethical
118 standards laid down in the 1964 Declaration of Helsinki. Written informed consent was
119 obtained from all subjects prior to participation.

120

121 **SNP selection and genotyping**

122

123 In order to analyze the possible role of *TYK2* on the genetic susceptibility to Chagas
124 disease, we followed a candidate gene strategy to analyze single-nucleotide
125 polymorphisms (SNP) that have been previously associated with susceptibility to
126 develop different immune-mediated conditions (such as rheumatoid arthritis, systemic
127 lupus erythematosus and systemic sclerosis) [15, 16], and with putative functional
128 implications. The following three non-synonymous *TYK2* variants were then selected
129 according to this: rs34536443 (a proline to alanine change in the protein kinase region
130 2), rs12720356 (an isoleucine to serine change in the protein kinase 1 region), and

131 rs2304256 (a valine to phenylalanine change in the FERM domain region). By using
132 Polyphen-2 and SIFT predicting tools, rs34536443 and rs12720356 were predicted to be
133 damaging mutations, whereas rs2304256 was predicted to be a benign mutation [17,
134 18].

135

136 Genomic DNA was isolated following standard procedures. The samples were
137 genotyped using TaqMan assays (Applied Biosystems, Foster City, California, USA) on
138 a LightCycler 480 real-time PCR system (Roche Diagnostics, Basel, Switzerland).

139

140 **Statistical analysis**

141

142 The Hardy-Weinberg equilibrium was determined at a significance level of 0.01 for all
143 groups of individuals. To test for association, we compared the allelic and genotypic
144 frequencies between seronegative and seropositive individuals as well as between
145 asymptomatic and chronic Chagas cardiomyopathy patients. Statistical significance for
146 these comparisons was determined using the χ^2 test and logistic regression analysis,
147 when necessary. The Benjamini & Hochberg step-up false discovery rate (FDR)
148 correction was used in all analyses to control for multiple testing effects. Odds ratios
149 (OR) and 95% confidence intervals (CI) were calculated according to Woolf's method.
150 P-values lower than 0.05 were considered statistically significant. Pairwise linkage
151 disequilibrium (LD) (D' and r^2) and haplotypic blocks were estimated using an
152 expectation-maximization algorithm as implemented in Haploview v4.2 [19]. The
153 statistical software package Plink V1.07 (<http://pngu.mgh.harvard.edu/purcell/plink>)
154 [20] was used for all statistical analyses. The statistical power of our study was

155 estimated with Power Calculator for Genetic Studies 2006 (CaTS)

156 (<http://www.sph.umich.edu/csg/abecasis/CaTS/>) [21].

157

158 **Results**

159

160 The statistical power of this study is detailed in **S1 Table** (Supporting information). The
161 three *TYK2* SNPs were in Hardy-Weinberg equilibrium in all the analyzed cohorts
162 ($P > 0.01$), and the genotyping success rate was over 95% for all analyzed genetic
163 variants. In all cases, r^2 values between each pair of SNPs were < 0.25 , indicating
164 possible independency amongst them.

165

166 In order to evaluate the association between *TYK2* gene variants and susceptibility to *T.*
167 *cruzi* infection, the allelic and genotypic frequencies of seronegative and seropositive
168 individuals were compared (**Table 1**). For all tested SNPs, no statistically significant
169 differences were observed in this comparison, thus suggesting that they do not influence
170 the risk of infection by *T. cruzi*.

171

172 **Table 1. Genotype and allele distribution for TYK2 polymorphisms in seronegative and seropositive individuals**

173

SNP	I/2	Group (N)	Genotype: N (%)			MAF %	P	Allele test	
			I/I	I/2	2/2			OR	95% CI
rs34536443	C/G	Seronegative (436)	0 (0.00)	11 (2.52)	425 (97.48)	1.26			
		Seropositive (546)	1 (0.18)	21 (3.85)	524 (95.97)	2.11	0.1538	1.68	[0.82-3.47]
rs12720356	C/A	Seronegative (436)	1 (0.23)	37 (8.49)	398 (91.28)	4.47			
		Seropositive (546)	4 (0.73)	34 (6.23)	508 (93.04)	3.85	0.4880	0.85	[0.55-1.33]
rs2304256	A/C	Seronegative (431)	20 (4.64)	146 (33.87)	265 (61.48)	21.58			
		Seropositive (540)	21 (3.89)	185 (34.26)	334 (61.85)	21.02	0.7648	0.97	[0.78-1.20]

174

175

176 On the other hand, we evaluated the possible association between *TYK2* genetic variants
177 and chronic Chagas cardiomyopathy by comparing the allelic and genotypic frequencies
178 of the *TYK2* SNPs between seropositive asymptomatic individuals and chronic Chagas
179 cardiomyopathy individuals (**Table 2**). Again, no statistically significant differences
180 were observed for any of the analyzed genetic variants. However, in this case, we
181 observed a marked difference in the homozygous frequency of the rs2304256*A allele,
182 which was reduced in the chronic cardiomyopathy group of patients. This difference
183 was shown to be statistically significant by logistic regression analysis under a recessive
184 model ($P = 0.0114$, $P_{FDR} = 0.0343$, $OR = 0.32$, $95\%CI = 0.13-0.77$). These results
185 support a possible involvement of this genotype in the development of cardiac
186 symptoms on infected individuals. Considering that a possible limitation in this study
187 could be the different average age between the different groups of patients
188 (Asymptomatic and chronic Chagas cardiomyopathy individuals), we performed an
189 additional analysis of the genotypic frequency of the rs2304256 polymorphism using
190 age as covariate. The statistical significance was maintained in this analysis (**S2 Table**)
191 (Supporting information).

192

193 **Table 2. Genotype and allele distribution for *TYK2* polymorphisms in asymptomatic and chronic Chagas cardiomyopathy (CCC)**
 194 **individuals**

195

SNP	1 2	Group (N)	Genotype. N (%)				MAF %	P	Allele test	
			1 1	1 2	2 2	OR [95% CI]				
rs34536443	C G	Asymptomatic (170)	1 (0.59)	5 (2.94)	164 (96.47)	2.06				
		CCC (376)	0 (0.00)	16 (4.26)	360 (95.74)	2.13	0.9415	1.03	[0.42-2.54]	
rs12720356	C A	Asymptomatic (170)	2 (1.18)	12 (7.06)	156 (91.76)	4.71				
		CCC (376)	2 (0.53)	22 (5.85)	352 (93.62)	3.46	0.3205	0.73	[0.38-1.37]	
rs2304256	A C	Asymptomatic (167)	12 (7.19)	54 (32.34)	101 (60.48)	23.35				
		CCC (373)	9 (2.41)	131 (35.12)	233 (62.47)	19.97	0.2176 [†]	0.82	[0.60-1.12] [†]	

196

197 [†]Recessive model test: P-value = 0.0114, P_{FDR} = 0.0343

198 [‡]Recessive model test: OR [95% CI] = 0.32 [0.13-0.77]

199

200

201 Finally, to study the possible association between the frequency of the A/A genotype of
202 rs2304256 and progression of cardiomyopathy, we tested a recessive model of this
203 genotype by grouping asymptomatic + CII individuals and CIII + CIV individuals. The
204 frequency was reduced in the early cardiomyopathy group (Asymptomatic + CII)
205 compared to the advanced cardiomyopathy group (CIII+CIV), being this difference
206 almost significant ($P = 0.0540$, $P_{FDR} = 0.1619$, $OR = 0.34$, $95\% CI = [0.11-1.01]$) (**S3**
207 **Table**). The results of this analysis suggest that this genotype could influence the
208 appearance of symptoms, and it may be implicated in the disease progression.

209

210 **Discussion**

211

212 *TYK2* rs2304256 represents a non-synonymous change (Val362Phe) within the FERM
213 domain of the encoded protein. This region comprises 300 amino acids and it has been
214 implicated in the interaction with transmembrane proteins such as cytokine receptors.
215 Additionally, this motif binds the kinase domain and positively regulates catalytic
216 activity [22]. According to prediction tools [17, 18], the Val362Phe amino acid change
217 is likely benign thus indicating that it favors the protein activity. This is consistent with
218 our observations, as they suggest that homozygosity for the minor allele could have an
219 improved cytokine signal transduction increasing the immune response to the parasite
220 on infected individuals. As mentioned before, immunity to *T. cruzi* infection starts with
221 a strong innate response together with the production of both IL-12 and TNF- α , which
222 finally induces the production of IFN- γ by several cells [5]. Previous studies with *TYK2*
223 knockout mice, as well as with patients with different mutations of the *TYK2* gene,
224 showed increased susceptibility to infection and an abnormal cytokine signaling,
225 affecting IL-12 induction of IFN- γ production [11, 12, 14]. Taking all this into
226 consideration, it could be speculated that infected patients carrying this genotype have
227 an increased capacity of inducing an adaptive response against *T. cruzi*. This
228 characteristic may improve the immune response during the late phases of infection,
229 helping the parasite clearance and avoiding the development of cardiac abnormalities.
230 Nevertheless, this study has some limitations that should be considered, including the
231 reduced number of analyzed patients and the lack of functional data supporting our
232 findings. Additional studies are therefore required to establish the *TYK2* variant
233 rs2304256 as a putative prognostic marker.

234

235 The other two *TYK2* variants, namely rs34536443 and rs12720356, were not statistically
236 associated to infection or severity of the disease in the analyzed population, despite
237 being also non-synonymous SNPs located on the kinase domains of the protein [15].
238 The lack of association in these cases could be explained by the low minor allele
239 frequency that both SNPs have in the Colombian population (<5%), which implies a
240 lower power to detect possible moderate effects. Hence, these two variants should not
241 be ruled out as risk factors for Chagas disease until more powered studies were carried
242 out.

243

244 *TYK2* deficiency has been evaluated in other infectious diseases. In *Leishmania*, for
245 instance, knockout mice showed an altered course of infection by *Leishmania major*
246 parasites, displaying larger skin lesions and increased tissues parasite burdens during
247 the middle stage of infection, lack of cytotoxicity of natural killer cells after stimulation
248 by IL-12, decreased IFN- γ production by NK and CD8⁺ T cells and lowered production
249 of inducible nitric oxide synthase (iNOS) [23]. These findings support our hypothesis of
250 *TYK2* gene variants influencing the outcome of the infection as similar to that observed
251 in *Leishmania*, IL-12 is essential for *T. cruzi* clearance.

252

253 Moreover, *TYK2* has been also involved in the predisposition to autoimmune diseases
254 like systemic lupus erythematosus (SLE) [24, 25], rheumatoid arthritis (RA) [15] and
255 systemic sclerosis (SSc) [16]. In particular, *TYK2* rs2304256*A have been found to be
256 associated with disease severity in SLE patients [24, 25], contrary to that observed in
257 our study, as this allele was associated to protection against Chagas disease severity.
258 However, this is not the first dual-relationship among genetic markers in autoimmune
259 and infectious diseases. For example, the *FOXO3* SNP rs12212067*G was related to a

260 milder clinical expression of both Crohn's Disease (CD) and RA, but to a more severe
261 phenotype in malaria [26]. The discrepancy was attributed to the regulatory function of
262 FOXO3 in the immune response; in which it favors the control of inflammatory
263 processes thus impeding the management of the parasite replication. We speculate that a
264 similar scenario may be plausible for *TYK2* rs2304256*A, *.i.e.* it facilitates parasite
265 clearance but could generate tissue damage and inflammation in autoimmune diseases.
266 Regarding SSc, the three variants included in our study were found to be statistically
267 associated to disease risk, although it was suggested that the association was driven
268 mainly by the rare variants rs34536443 and rs12720356 [16]. We did not observed
269 evidences of association between these two polymorphisms and severity of Chagas
270 disease. However, our study cohort was clearly underpowered compared with that
271 included in the SSc study (171 asymptomatic / 376 CCC individuals vs. 7,103 SSc
272 patients / 12,220 controls). Consequently, the possible implication of these two *TYK2*
273 variants in the severity of Chagas disease cannot be excluded without confirmation in
274 larger sample sets.

275

276 This study has some limitations. One of them is the lack of functional data supporting
277 our findings. In this regard, although this work is part of an exploratory study which
278 main goal is to elucidate the genetic basis of differential susceptibility to Chagas
279 Disease, future functional studies would represent a very valuable contribution to better
280 understand the reported association. In addition, confirmation of our results in larger
281 sample sets and independent populations of other endemic areas would be also
282 desirable. Finally, age at onset could not be included as covariate in the CCC analyses,
283 as this information was not available in most cases.

284

285 In conclusion, our results suggest that the *TYK2* gene variant rs2304256 could be an
286 important player in the development of cardiomyopathy on infected individuals by *T.*
287 *cruzi*. This role could be related to a different *TYK2* functionality in the immune
288 response during the infection. Further studies on this gene with different populations
289 and larger samples sizes, as well functional analyses, are needed to validate our
290 findings.

291

292

293 **Acknowledgements**

294

295 This work is part of the doctoral thesis “Estudio de las bases genéticas de la enfermedad
296 de Chagas” from the Biomedicine PhD program at the Universidad de Granada (Spain).

297

298

299 **References**

- 300 1. Chagas disease in Latin America: an epidemiological update based on 2010
301 estimates. *Releve epidemiologique hebdomadaire / Section d'hygiene du*
302 *Secretariat de la Societe des Nations = Weekly epidemiological record / Health*
303 *Section of the Secretariat of the League of Nations.* 2015;90(6):33-43. Epub
304 2015/02/13. PubMed PMID: 25671846.
- 305 2. Bern C. Chagas' Disease. *The New England journal of medicine.*
306 2015;373(5):456-66. Epub 2015/07/30. doi: 10.1056/NEJMra1410150. PubMed
307 PMID: 26222561.
- 308 3. Chapman SJ, Hill AV. Human genetic susceptibility to infectious disease. *Nature*
309 *reviews Genetics.* 2012;13(3):175-88. Epub 2012/02/09. doi: 10.1038/nrg3114.
310 PubMed PMID: 22310894.
- 311 4. Cunha-Neto E, Chevillard C. Chagas disease cardiomyopathy: immunopathology
312 and genetics. *Mediators of inflammation.* 2014;2014:683230. Epub 2014/09/12.
313 doi: 10.1155/2014/683230. PubMed PMID: 25210230; PubMed Central PMCID:
314 PMC4152981.
- 315 5. Junqueira C, Caetano B, Bartholomeu DC, Melo MB, Ropert C, Rodrigues MM,
316 et al. The endless race between *Trypanosoma cruzi* and host immunity: lessons for
317 and beyond Chagas disease. *Expert reviews in molecular medicine.* 2010;12:e29.
318 Epub 2010/09/16. doi: 10.1017/S1462399410001560. PubMed PMID: 20840799.
- 319 6. Zafra G, Morillo C, Martin J, Gonzalez A, Gonzalez CI. Polymorphism in the 3'
320 UTR of the IL12B gene is associated with Chagas' disease cardiomyopathy.
321 *Microbes and infection / Institut Pasteur.* 2007;9(9):1049-52. Epub 2007/07/24.
322 doi: 10.1016/j.micinf.2007.04.010. PubMed PMID: 17644387.

- 323 7. Torres OA, Calzada JE, Beraun Y, Morillo CA, Gonzalez A, Gonzalez CI, et al.
324 Role of the IFNG +874T/A polymorphism in Chagas disease in a Colombian
325 population. *Infection, genetics and evolution : journal of molecular epidemiology*
326 *and evolutionary genetics in infectious diseases.* 2010;10(5):682-5. Epub
327 2010/04/03. doi: 10.1016/j.meegid.2010.03.009. PubMed PMID: 20359550.
- 328 8. Criado L, Florez O, Martin J, Gonzalez CI. Genetic polymorphisms in
329 TNFA/TNFR2 genes and Chagas disease in a Colombian endemic population.
330 *Cytokine.* 2012;57(3):398-401. Epub 2012/01/10. doi:
331 10.1016/j.cyto.2011.12.007. PubMed PMID: 22221522.
- 332 9. Ihle JN. Cytokine receptor signalling. *Nature.* 1995;377(6550):591-4. Epub
333 1995/10/19. doi: 10.1038/377591a0. PubMed PMID: 7566171.
- 334 10. Karaghiosoff M, Neubauer H, Lassnig C, Kovarik P, Schindler H, Pircher H, et al.
335 Partial impairment of cytokine responses in Tyk2-deficient mice. *Immunity.*
336 2000;13(4):549-60. Epub 2000/11/09. PubMed PMID: 11070173.
- 337 11. Shimoda K, Kato K, Aoki K, Matsuda T, Miyamoto A, Shibamori M, et al. Tyk2
338 plays a restricted role in IFN alpha signaling, although it is required for IL-12-
339 mediated T cell function. *Immunity.* 2000;13(4):561-71. Epub 2000/11/09.
340 PubMed PMID: 11070174.
- 341 12. Shimoda K, Tsutsui H, Aoki K, Kato K, Matsuda T, Numata A, et al. Partial
342 impairment of interleukin-12 (IL-12) and IL-18 signaling in Tyk2-deficient mice.
343 *Blood.* 2002;99(6):2094-9. Epub 2002/03/06. PubMed PMID: 11877284.
- 344 13. Minegishi Y, Saito M, Morio T, Watanabe K, Agematsu K, Tsuchiya S, et al.
345 Human tyrosine kinase 2 deficiency reveals its requisite roles in multiple cytokine
346 signals involved in innate and acquired immunity. *Immunity.* 2006;25(5):745-55.
347 Epub 2006/11/08. doi: 10.1016/j.immuni.2006.09.009. PubMed PMID: 17088085.

- 348 14. Kreins AY, Ciancanelli MJ, Okada S, Kong XF, Ramirez-Alejo N, Kilic SS, et al.
349 Human TYK2 deficiency: Mycobacterial and viral infections without hyper-IgE
350 syndrome. *The Journal of experimental medicine*. 2015;212(10):1641-62. Epub
351 2015/08/26. doi: 10.1084/jem.20140280. PubMed PMID: 26304966; PubMed
352 Central PMCID: PMC4577846.
- 353 15. Diogo D, Bastarache L, Liao KP, Graham RR, Fulton RS, Greenberg JD, et al.
354 TYK2 protein-coding variants protect against rheumatoid arthritis and
355 autoimmunity, with no evidence of major pleiotropic effects on non-autoimmune
356 complex traits. *PloS one*. 2015;10(4):e0122271. Epub 2015/04/08. doi:
357 10.1371/journal.pone.0122271. PubMed PMID: 25849893; PubMed Central
358 PMCID: PMC4388675.
- 359 16. Lopez-Isac E, Campillo-Davo D, Bossini-Castillo L, Guerra SG, Assassi S,
360 Simeon CP, et al. Influence of TYK2 in systemic sclerosis susceptibility: a new
361 locus in the IL-12 pathway. *Annals of the rheumatic diseases*. 2015. Epub
362 2015/09/05. doi: 10.1136/annrheumdis-2015-208154. PubMed PMID: 26338038.
- 363 17. Adzhubei IA, Schmidt S, Peshkin L, Ramensky VE, Gerasimova A, Bork P, et al.
364 A method and server for predicting damaging missense mutations. *Nature*
365 *methods*. 2010;7(4):248-9. Epub 2010/04/01. doi: 10.1038/nmeth0410-248.
366 PubMed PMID: 20354512; PubMed Central PMCID: PMC2855889.
- 367 18. Kumar P, Henikoff S, Ng PC. Predicting the effects of coding non-synonymous
368 variants on protein function using the SIFT algorithm. *Nature protocols*.
369 2009;4(7):1073-81. Epub 2009/06/30. doi: 10.1038/nprot.2009.86. PubMed
370 PMID: 19561590.

- 371 19. Barrett JC, Fry B, Maller J, Daly MJ. Haploview: analysis and visualization of LD
372 and haplotype maps. *Bioinformatics*. 2005;21(2):263-5. Epub 2004/08/07. doi:
373 10.1093/bioinformatics/bth457. PubMed PMID: 15297300.
- 374 20. Purcell S, Neale B, Todd-Brown K, Thomas L, Ferreira MA, Bender D, et al.
375 PLINK: a tool set for whole-genome association and population-based linkage
376 analyses. *American journal of human genetics*. 2007;81(3):559-75. Epub
377 2007/08/19. doi: 10.1086/519795. PubMed PMID: 17701901; PubMed Central
378 PMCID: PMC1950838.
- 379 21. Skol AD, Scott LJ, Abecasis GR, Boehnke M. Joint analysis is more efficient than
380 replication-based analysis for two-stage genome-wide association studies. *Nature*
381 *genetics*. 2006;38(2):209-13. Epub 2006/01/18. doi: 10.1038/ng1706. PubMed
382 PMID: 16415888.
- 383 22. Yamaoka K, Saharinen P, Pesu M, Holt VE, 3rd, Silvennoinen O, O'Shea JJ. The
384 Janus kinases (Jaks). *Genome biology*. 2004;5(12):253. Epub 2004/12/04. doi:
385 10.1186/gb-2004-5-12-253. PubMed PMID: 15575979; PubMed Central PMCID:
386 PMC545791.
- 387 23. Schleicher U, Mattner J, Blos M, Schindler H, Rollinghoff M, Karaghiosoff M, et
388 al. Control of *Leishmania major* in the absence of Tyk2 kinase. *European journal*
389 *of immunology*. 2004;34(2):519-29. Epub 2004/02/10. doi:
390 10.1002/eji.200324465. PubMed PMID: 14768057.
- 391 24. Suarez-Gestal M, Calaza M, Endreffy E, Pullmann R, Ordi-Ros J, Sebastiani GD,
392 et al. Replication of recently identified systemic lupus erythematosus genetic
393 associations: a case-control study. *Arthritis research & therapy*. 2009;11(3):R69.
394 Epub 2009/05/16. doi: 10.1186/ar2698. PubMed PMID: 19442287; PubMed
395 Central PMCID: PMC2714115.

- 396 25. Hellquist A, Jarvinen TM, Koskenmies S, Zucchelli M, Orsmark-Pietras C,
397 Berglind L, et al. Evidence for genetic association and interaction between the
398 TYK2 and IRF5 genes in systemic lupus erythematosus. *The Journal of*
399 *rheumatology*. 2009;36(8):1631-8. Epub 2009/07/02. doi:
400 10.3899/jrheum.081160. PubMed PMID: 19567624.
- 401 26. Lee JC, Espeli M, Anderson CA, Linterman MA, Pocock JM, Williams NJ, et al.
402 Human SNP links differential outcomes in inflammatory and infectious disease to
403 a FOXO3-regulated pathway. *Cell*. 2013;155(1):57-69. Epub 2013/09/17. doi:
404 10.1016/j.cell.2013.08.034. PubMed PMID: 24035192; PubMed Central PMCID:
405 PMC3790457.
- 406

407 **Supporting Information**

408

409 **S1 Table. Statistical power calculation of our study considering three different OR**
410 **values.**

411 **S2 Table. Recessive model analysis for *TYK2* polymorphisms in asymptomatic and**
412 **chronic Chagas cardiomyopathy (CCC) individuals using age as covariate.**

413 **S3 Table. Recessive model analysis for *TYK2* polymorphisms in early chronic**
414 **Chagas cardiomyopathy (Asymptomatic + CII) and advanced chronic Chagas**
415 **cardiomyopathy (CIII+CIV) individuals.**

416

1 **S1 Table. Statistical power calculation of our study considering three different OR**
2 **values**

	Statistical power calculation	
	<i>T. cruzi</i> infection (436/547)*	Chronic Chagasic cardiomyopathy (171/376)**
OR=1.50	97%	75%
OR=1.25	54%	29%
OR=1.10	14%	9%

3 The estimation was performed considering a prevalence of 1.44% and a minor allele
4 frequency of 20%.

5 *Analysis performed by using 436 seronegative vs. 547 seropositive individuals.

6 **Analysis performed by using 171 asymptomatic vs. 376 chronic Chagas
7 cardiomyopathy individuals.

8 **S2 Table. Recessive model analysis for *TYK2* polymorphisms in asymptomatic and chronic Chagas cardiomyopathy (CCC) individuals**
9 **using age as covariate**

SNP	I 2	Group (N)	Genotype. N (%)			Recessive model test / Age			
			I 1	I 2	2 2	MAF %	P	P _{FDR}	OR [95% CI]
rs2304256	A C	Asymptomatic (167)	12 (7.19)	54 (32.34)	101 (60.48)	23.35			
		CCC (373)	9 (2.41)	131 (35.12)	233 (62.47)	19.97	0.0150	0.0451	0.32 [0.13-0.80]

10

11

12 **S3 Table S3. Recessive model analysis for *TYK2* polymorphisms in early chronic Chagas cardiomyopathy (Asymptomatic + CII) and**
13 **advanced chronic Chagas cardiomyopathy (CIII+CIIV) individuals**

SNP	I 2	Group (N)	Genotype. N (%)			Recessive model test / Age			
			I 1	I 2	2 2	MAF %	P	P _{FDR}	OR [95% CI]
rs2304256	A C	I+II (323)	17 (5.26)	101 (31.27)	205 (63.47)	20.90			
		III+IV (217)	4 (1.84)	84 (38.71)	129 (59.45)	21.20	0.0540	0.1619	0.32 [0.10-1.01]

14

8. Discusión

8.1. Resumen de resultados

8.1.1. *IL17A*

Después del análisis de las variantes genéticas de *IL17A* en la cohorte de la presente tesis doctoral, observamos que dos polimorfismos estaban asociados a riesgo de infección al comparar las frecuencias alélicas presentes en individuos seronegativos vs las frecuencias alélicas en los individuos seropositivos. Para el SNP rs8193036, la frecuencia del alelo C estaba incrementada en los individuos seronegativos ($P = 0.0170$, $OR = 0.80$, $IC = 0.66-0.96$), no obstante después de aplicar la corrección de Benjamini y Hochberg, la significancia estadística se perdió ($P_{FDR} = 0.0851$). Para el rs2275913, la frecuencia del alelo A era mayor en los individuos seropositivos ($P = 0.0453$, $OR = 1.23$, $IC = 1.00-1.51$), sin embargo, de manera similar al otro polimorfismo, la significancia estadística se perdió después de la corrección de BH ($P_{FDR} = 0.1133$) (148).

Posteriormente, cuando se evaluaron las frecuencias de los SNPs en los individuos con cardiomiopatía Chagásica crónica vs los individuos asintomáticos, no se encontraron diferencias significativas entre los grupos para ninguna de las variantes genéticas (148).

Por otra parte, se hizo un análisis adicional comparando los individuos seronegativos con los pacientes con cardiomiopatía Chagásica crónica. En

el caso del rs8193036, la frecuencia del alelo minoritario C fue menor en los individuos con cardiomiopatía Chagásica crónica y estadísticamente significativa comparada con los individuos seronegativos ($P = 0.0065$, $P_{\text{FDR}} = 0.0324$, $OR = 0.75$, $IC = 0.60-0.92$) (148).

8.1.2. *IL18*

En el estudio del gen de la *IL18*, cuatro de los seis polimorfismos analizados presentaban frecuencias alélicas estadísticamente significativas entre individuos seropositivos y seronegativos, lo que mostraba una asociación diferencial a riesgo de infección. Estos fueron **rs2043055** ($P = 2.52E-03$, $P_{\text{FDR}} = 5.04E-03$, $OR = 1.29$, $IC = 1.10-1.53$), **rs187238** ($P = 2.18E-03$, $P_{\text{FDR}} = 5.04E-03$, $OR = 0.77$, $IC = 0.65-0.91$), **rs1946518** ($P = 0.0162$, $P_{\text{FDR}} = 0.0243$, $OR = 1.22$, $IC = 1.04-1.44$) y **rs360719** ($P = 1.49E-03$, $P_{\text{FDR}} = 5.04E-03$, $OR = 0.76$, $IC = 0.64-0.90$) (149).

Particularmente, en este estudio se halló que estos cuatro polimorfismos tenían un alto nivel de LD en la población analizada. Debido a esto, fue necesario realizar un análisis de regresión logística condicionada para observar si dicho desequilibrio podía estar enmascarando una única variante causal de asociación a riesgo de infección. Después de este análisis, se observó que el rs360719 puede ser la variante que explique la asociación hallada a riesgo de infección (149).

Por otra parte, en el análisis que comparó las frecuencias alélicas y genotípicas de los SNPs de los pacientes asintomáticos y los pacientes con cardiomiopatía Chagásica crónica no se detectaron diferencias estadísticamente significativas lo que parece indicar que este gen no influye en el riesgo de avance de la enfermedad, al menos en esta población (149).

Por último, se realizó un análisis de asociación de los haplotipos del gen *IL18* hallados en esta población. Dos haplotipos, TCAC y CGCT, mostraron diferencias estadísticamente significativas cuando se compararon sus frecuencias en los individuos seronegativos con las frecuencias de los pacientes seropositivos ($P = 1.50E-03$, $P_{FDR} = 7.50E-03$, $P_{PERM} = 4.90E-03$, $OR = 0.76$, $IC = 0.65-0.90$, y $P = 0.0116$, $P_{FDR} = 0.0290$, $P_{PERM} = 0.0428$, $OR = 1.25$, $IC = 1.05-1.47$). Sin embargo, al hacer una comparación de los modelos haplotípicos y alélicos por medio de una prueba de bondad de ajuste, se estableció que el modelo haplotípico no explicaba mejor la asociación observada, indicando que la asociación haplotípica es consecuencia de la asociación alélica (149).

8.1.3. *FOXO3*

Cuando se analizó la variante rs12212067 en las cohortes del presente estudio, se encontró que las frecuencias alélicas y genotípicas no variaron significativamente cuando se compararon los individuos seropositivos con los individuos seronegativos, ni cuando se compararon los pacientes con cardiomiopatía Chagásica crónica y los pacientes asintomáticos seropositivos, indicando que la variante analizada posiblemente no influía en el riesgo de infección o desarrollo de cardiomiopatía Chagásica crónica en esta población (150).

8.1.4. *VDR*

En el estudio del gen *VDR*, de las cuatro variantes analizadas, la frecuencia alélica del alelo rs2228570*A era significativamente mayor en los individuos seronegativos comparada con la frecuencia en los individuos seropositivos ($P = 0.0287$, $OR = 0.81$, $IC = 0.67-0.98$), no

obstante este nivel de significancia se perdió después de la corrección por BH ($P_{\text{FDR}} = 0.1147$). Las frecuencias alélicas y genotípicas de los otros polimorfismos no mostraron ninguna diferencia entre estos dos grupos de pacientes (151).

En el caso de la comparación de las frecuencias alélicas de los SNP de los pacientes asintomáticos y los pacientes con cardiomiopatía Chagásica crónica, el polimorfismo rs2228570 mostró una asociación estadísticamente significativa, en donde la frecuencia del alelo A era mayor en los individuos con cardiomiopatía Chagásica crónica ($P = 4.46\text{E-}03$, OR = 1.51, IC = 1.14-2.00), manteniendo dicho nivel de significancia después de la corrección ($P_{\text{FDR}} = 0.0178$) (151).

Adicionalmente, tres polimorfismos presentaron un alto grado de LD en la población de estudio. Estos fueron rs731236, rs7975232 y rs1544410. No obstante, al realizarse un análisis de asociación de haplotipos tanto a riesgo de infección como a riesgo de avance la enfermedad, no se halló diferencias significativas en ninguno de los análisis realizados (151).

8.1.5. *TYK2*

Finalmente, en el análisis del gen *TYK2*, no se encontraron diferencias alélicas de los polimorfismos analizados cuando se compararon los individuos seropositivos con los individuos seronegativos.

Este resultado fue similar cuando se compararon las frecuencias alélicas de los SNPs en los pacientes seropositivos asintomáticos vs los pacientes con cardiomiopatía Chagásica crónica. Sin embargo, en este caso en particular se observó que la frecuencia del genotipo homocigoto de rs2304256*A era mayor en los individuos asintomáticos comparado con

la frecuencia de los individuos con cardiomiopatía Chagásica crónica, siendo esta diferencia estadísticamente significativa ($P = 0.0114$, $P_{FDR} = 0.0343$, $OR = 0.32$, $IC = 0.13-0.77$).

8.2. Variantes genéticas y susceptibilidad a infección por *Trypanosoma cruzi*

El primer objetivo trazado por el presente estudio fue determinar cuáles de los genes analizados en la población colombiana podían estar asociados a una susceptibilidad diferenciada a la infección. De acuerdo a los resultados obtenidos dos genes, *IL17A* e *IL18*, parecen influir en dicho riesgo (148, 149).

Como se mencionaba anteriormente, el gen *IL17A* codifica la proteína IL-17A, una citoquina pro-inflamatoria que sirve como puente entre las respuestas inmune innata y respuesta inmune adaptativa (94). Este hecho hace muy relevante el hallazgo de la presente tesis doctoral. El papel de IL-17A en respuesta a diferentes patógenos está bien establecido (96-98), adicionalmente en la enfermedad de Chagas se ha determinado que los niveles de esta interleuquina en sangre están directamente relacionados con el grado de afección de los individuos infectados, en donde los niveles altos de IL-17A protegen a los individuos de la aparición de la cardiomiopatía crónica Chagásica (99-101). Cabe destacar que los polimorfismos analizados de *IL17A* están localizados en la zona promotora del gen, y particularmente en el caso de rs8193036 se ha visto asociado a cambios en los niveles de transcripción de la proteína; un estudio previo realizado en población coreana mostró que el alelo rs8193036*C estaba relacionado con menores niveles de producción de IL-17A en pacientes con enfermedad inflamatoria intestinal (152). Es importante resaltar que para la población asiática el alelo minoritario es el rs8193036*T con una frecuencia del 30%, mientras que para nuestra población de estudio el alelo minoritario es el rs8193036*C con una frecuencia del 27%. Debido a que no contamos con datos funcionales, no

podemos asegurar que dicho polimorfismo sea en sí la variante causal que altera los niveles de la producción de la IL-17A. Sin embargo, esto permite pensar que dicho polimorfismo podría estar en LD con la variante causal y que esto hace que ante la invasión por *T. cruzi*, el sistema inmune de las personas afectadas responda de manera diferente ante la infección.

La cohorte analizada en el presente estudio contiene un grupo definido como individuos seronegativos. Este grupo no presenta anticuerpos que reconozcan los antígenos de *T. cruzi*. Este hecho abre dos posibilidades, la primera es que los individuos nunca hayan tenido contacto con el parásito, y la segunda es que los individuos hayan tenido contacto con el parásito pero por alguna razón particular no posean anticuerpos anti-*Trypanosoma cruzi*. Este último escenario a su vez permite abrir dos posibilidades más, la primera consiste en que no se desarrollan anticuerpos durante la infección, o un proceso de seroconversión. De acuerdo a los informes, en esta cohorte no se ha presentado la seroconversión y los individuos viven en zonas endémicas con gran exposición a transmisión vectorial. Esto permite postular que la hipótesis más creíble es que los individuos seronegativos hayan tenido contacto con el parásito y no hayan desarrollado anticuerpos. Este fenómeno podría deberse a una gran respuesta de tipo innato inflamatorio que haya eliminado la infección del parásito antes de pasar a una respuesta inmune de tipo adaptativo que dé lugar a la aparición de anticuerpos. Este fenómeno es similar a lo observado en otros parásitos tales como *Leishmania* (96, 97) o malaria (98), donde esta citoquina favorece en gran medida la eliminación de los parásitos.

No hay que olvidar que los resultados pierden su nivel de significancia estadística después de la corrección de BH, sin embargo se mantienen una tendencia (rs8193036: $P = 0.0170$, $P_{FDR} = 0.0851$), por lo tanto es

necesario pensar en cohortes de replicación, con un mayor número de individuos y en la medida de lo posible de diferentes zonas endémicas para confirmar lo anteriormente planteado.

Similar al caso de *IL17A*, los análisis de las variantes del gen *IL18* arrojaron una asociación a riesgo de infección. Este gen codifica una citoquina pro-inflamatoria, la IL-18, cuyo papel en la respuesta inmune ha sido ampliamente descrito (102). Una de las características fundamentales de IL-18 es su función de inducir la producción de IFN- γ en distintos tipos celulares (103, 104). Este tipo de interferón es crucial en la respuesta inmune a infección por *T. cruzi*, ya que es parte esencial de la conexión de respuesta inmune innata y adaptativa, y controla la replicación del parásito en los tejidos del hospedero (153). Adicionalmente, trabajos previos con polimorfismos del gen *IL18* mostraron que ciertas variantes alélicas podían influir el riesgo de infección y gravedad de distintas enfermedades infecciosas, incluida la enfermedad de Chagas (90).

En el presente trabajo, se abordó una evaluación completa del gen *IL18*, incluyendo distintos SNPs a lo largo del gen y la región promotora. Entre los polimorfismos analizados se encuentra el rs360719, un polimorfismo que según datos experimentales interactúa con un factor de transcripción alterando los niveles de expresión de IL-18 (140). Según los análisis, en la cohorte del presente estudio, el alelo rs360719*C está asociado a protección en contra de la infección por *T. cruzi* ($P = 1.49E-03$, $P_{FDR} = 5.04E-03$). Este alelo favorecería una mayor producción de IL-18, lo que hace que los individuos que lo porten puedan tener niveles incrementados de esta interleuquina en la respuesta inmune ante el parásito, potenciando así la producción de IFN- γ y que posiblemente tengan una eliminación de la infección más eficiente, permitiendo incluso que la infección desaparezca antes de la aparición de anticuerpos. Además, según los

análisis de condicionamiento y de bondad de ajuste, esta variante explicaría las otras asociaciones observadas en el estudio, tanto alélicas como haplotípicas.

Nuestro planteamiento es que en ambos casos, tanto para *IL17A* como para *IL18*, las variantes polimórficas parecen favorecer un ambiente proinflamatorio que eliminarían de manera más eficiente el parásito de los tejidos. Esto incluso evitaría la aparición de anticuerpos. Estos dos genes se unen al grupo de genes analizados en población colombiana que parecen proteger de la infección de *T. cruzi*, tales como los genes *TGFBI* (75), *MIF* (78) e *IFNG* (73). Es interesante observar que este grupo de genes corresponden a genes que codifican citoquinas y factores involucrados con respuesta inmune de tipo inflamatoria innata, que parecen potenciar una eliminación temprana de la infección, favoreciendo a ciertos individuos. Más adelante abordaremos un análisis integral de estos hallazgos, analizando las posibles interacciones entre los distintos genes que influyen en la susceptibilidad a la infección por *T. cruzi*.

8.3. Variantes genéticas y susceptibilidad a desarrollo de cardiomiopatía Chagásica crónica de individuos seropositivos a *T. cruzi*

El segundo objetivo que abarcaba la presente tesis era evaluar si las variantes de los genes estudiados conferían un riesgo diferencial a la aparición y el desarrollo de complicaciones cardíacas en los pacientes seropositivos. De los genes analizados en el presente estudio, uno de los SNPs analizados del gen de *VDR*, el rs2228570, mostró una asociación estadísticamente significativa a riesgo de desarrollo de cardiomiopatía Chagásica crónica en la población colombiana (151).

Este hallazgo es bastante interesante teniendo en cuenta la importancia de la vitamina D en el sistema inmune (118, 119). Este compuesto es esencial para la respuesta inmune de los individuos, ya que potencia procesos claves tales como la fagocitosis por macrófagos y la producción de péptidos antimicrobianos, pero a su vez, regula la producción de citoquinas pro-inflamatorias, entre las que se encuentran IFN- γ , IL-12, IL-17 y TNF- α (119). Estos elementos pro-inflamatorios son esenciales para la respuesta inmune ante el parásito ya que ayuda a su eliminación de los distintos tejidos y del torrente sanguíneo (88, 100, 153). Adicionalmente, distintos estudios apuntan a que una de las principales causas de la aparición de sintomatología grave en los individuos infectados es la persistencia parasitaria, que lleva a un problema de patología inmune (9, 10). Señalar que el alelo rs2228570*A del gen *VDR* crea un sitio alternativo de inicio de transcripción que da origen a un receptor alargado y con menor actividad transcripcional, reduciendo la respuesta a vitamina D en los distintos tipos celulares (141, 142). Debido a esto, es posible

pensar que dado que los individuos portadores de este alelo en la presente población de estudio, son menos sensibles a la acción de la vitamina D, y por ende existe una posibilidad menor de desregulación de la respuesta Th1, que ayuda a la eliminación del parásito y su vez a prevenir la aparición de lesiones en los tejidos que lleven a cardiomiopatía Chagásica crónica. Un elemento interesante que puede ser objeto de un futuro estudio en esta o en otra población es mirar como los niveles de vitamina D en sangre de los sujetos con distintos grados de avance de síntomas de cardiomiopatía.

Otro gen que mostró estar asociado al riesgo de desarrollo de cardiomiopatía Chagásica crónica en los pacientes analizados fue *TYK2*. Aunque en principio, ninguna de las frecuencias alélicas de los polimorfismos estudiados mostró una diferencia con un nivel de significancia estadística ($P < 0.05$) cuando se compararon los individuos asintomáticos con los pacientes cardiacos. No obstante, para el caso de la variante rs2304256, la frecuencia genotípica del homocigoto A/A fue menor en los individuos con cardiomiopatía Chagásica crónica, siendo esta diferencia estadísticamente significativa. Este SNP corresponde a una variante no sinónima del gen *TYK2*, localizada en el dominio FERM de la proteína, una región implicada en la interacción con otras proteínas, entre las que se puede encontrar receptores de citoquinas (154). Como se ha mencionado previamente, modelos experimentales habían mostrado que *TYK2* interactúa con IL-12 y que podían afectar significativamente la producción de IFN- γ (125-127). Debido a esto, es natural pensar que los individuos homocigotos para este alelo tienen un comportamiento diferente en su respuesta inmune durante la infección, lo que altera el grado de producción de IFN- γ , modificando los niveles de respuesta de distintos tipos celulares y en cierto punto, alterando la capacidad de eliminar completamente los parásitos. Ante este escenario, los individuos

pueden ser más susceptibles a sufrir una persistencia parasitaria que favorezca con el tiempo la aparición de daños en los tejidos, inflamación, y por último alteraciones estructurales que conduzcan a la cardiomiopatía.

Finalmente, otro gen cuyo análisis arrojó una asociación a avance de la enfermedad es *IL17A* (148). Para este gen, se hizo un análisis comparando dos grupos, el de los individuos seronegativos con los individuos seropositivos con cardiomiopatía Chagásica crónica. Para este análisis, la frecuencia alélica de la variante rs8193036*C era significativamente menor en los individuos con cardiomiopatía Chagásica crónica que en los individuos seronegativos, indicando un papel protector de esta variante. Este polimorfismo, como se había mencionado previamente, está asociado a un producción diferencial de niveles de ARN mensajero en los individuos (152), lo cual podría indicar que hay niveles diferentes de producción de IL-17A ante la infección de *T. cruzi*. Una de las características principales de IL-17A es su papel en la respuesta inflamatoria, que ayuda a la eliminación de la infección, vista en diferentes organismos parasitarios incluidos *T. cruzi*. Adicionalmente, se ha observado que IL-17A ayuda a modular la producción de IFN- γ y TNF- α (99), citoquinas claves en el proceso inmune contra el parásito. De manera similar, este resultado sugiere que, parecido a lo visto en los otros genes estudiados, un ambiente inflamatorio que potencie la eliminación del parásito puede favorecer la protección ante el avance de la enfermedad y posterior aparición de los síntomas de cardiomiopatía.

Ante este panorama, nuevamente observamos que genes de respuesta inmune inflamatoria que potencian la eliminación del parásito del organismo parecen estar relacionados con un riesgo diferencial al desarrollo de cardiomiopatía Chagásica crónica en la presente población. Estos resultados se unen a lo ya previamente observado en población

colombiana en genes como *IL1B* (70), *IL12B* (71), *TNFA* (72), *IL4RA* (74), *CCR2* y *CCR5* (76, 77). Este escenario es interesante y comprendería un amplio panorama de variantes genéticas relacionadas con riesgo de cardiomiopatía Chagásica crónica. Más adelante, y de manera similar con los resultados de asociación a riesgo a infección por *T. cruzi*, abordaremos un análisis global en el cual trataremos de establecer las distintas relaciones de los genes y cómo estas relaciones modifican el proceso inmune, alterando la capacidad de los individuos de eliminar el parásito y de desarrollar complicaciones crónicas.

Es importante tener en cuenta que posiblemente uno de los mayores limitantes de nuestro estudio es que particularmente nuestras cohortes de pacientes seropositivos presentaban una proporción casi de 3:1 de pacientes con cardiomiopatía Chagásica crónica versus pacientes asintomáticos. Esto se debe a que el reclutamiento de individuos seropositivos asintomáticos se dificulta ya que no acuden a citas médicas. No obstante, nosotros consideramos que los análisis realizados con estos grupos son suficientemente sólidos y permiten dilucidar las posibles asociaciones genéticas a riesgo de aparición y desarrollo de cardiomiopatía Chagásica crónica. En todo caso, es necesario que los análisis llevados a cabo en este trabajo, sean replicados en cohortes más grandes y en la medida de lo posible más homogéneas que incluyan números de individuos similares entre los distintos grupos (seronegativos, seropositivos asintomáticos y con cardiomiopatía Chagásica crónica).

8.4. Análisis conjunto de genes asociados a riesgo de infección y/o desarrollo de cardiomiopatía Chagásica crónica en población endémica colombiana

De acuerdo a los resultados obtenidos en la presente tesis, es importante observar que distintos polimorfismos de genes de la respuesta inmune pueden estar asociados tanto a riesgo de infección como a riesgo de desarrollo de cardiomiopatía Chagásica crónica. Estos nuevos descubrimientos se pueden reunir con hallazgos previos realizados en individuos de la misma área endémica, resumidos en la tabla 2, y tratar de realizar un análisis conjunto de posibles interacciones que permitan explicar las diferentes interacciones que existen entre las variantes genéticas.

Uno de los mayores retos que se presenta en el estudio de la genética de la enfermedad de Chagas es el hecho de ser una patología compleja, que involucra muchas interacciones de tipo hospedador-patógeno (2, 3, 5). Esto genera que en la respuesta inmune se vean involucradas muchas vías, y por ende diversas variantes alélicas de distintos genes pueden estar implicadas en el riesgo diferencial. Además, los hallazgos hasta el momento podrían decirse que son resultados preliminares y que todavía requieren de confirmación experimental, tanto de ensayos funcionales, como estudios de replicación. Sin embargo, existen herramientas bioinformáticas que podrían ser de utilidad para entender las distintas relaciones entre los hallazgos en la presente tesis, junto con los resultados de trabajos preliminares en población colombiana. Entre esas herramientas tenemos STRING V10 (Search Tool for The Retrieval of

Interacting Genes/Proteins) (155, 156), una base de datos que ha sido desarrollada con el fin de predecir las posibles interacciones entre distintas proteínas. Esta plataforma predice la interacción entre proteínas basado en diferentes fuentes y bases de datos constantemente actualizadas y depuradas, así como el uso de algoritmos predictores de interacciones que usan datos genómicos (155, 156).

Para realizar nuestro análisis reunimos los resultados obtenidos hasta la fecha, incluyendo genes analizados previamente a esta tesis (ver la tabla 2) así como los genes analizados durante este trabajo (*IL17A*, *IL18*, *VDR* y *TYK2*) (148, 149), que mostraban algún grado de asociación tanto a la infección por *T. cruzi* como al desarrollo de cardiomiopatía Chagásica crónica. En un primer análisis, el grupo de proteínas codificadas por cada uno de los genes investigados fue analizado sin distinguir entre las variantes de riesgo a infección de las variantes de riesgo de cardiomiopatía Chagásica crónica (**Figura 12**).

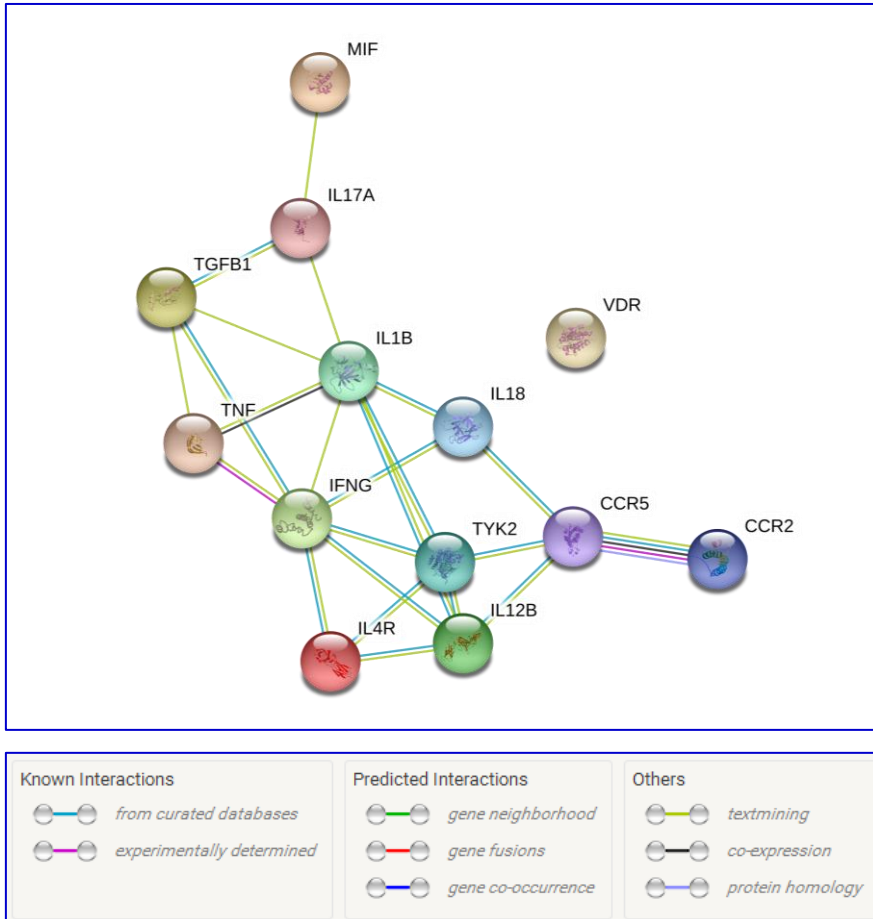


Figura 12. Red de interacciones entre los distintos productos de los genes evaluados en población colombiana, que están asociados a infección y/o desarrollo de cardiomiopatía Chagásica crónica determinada por STRING V10.

De acuerdo a este diagrama, vemos una compleja relación de interacciones entre las distintas proteínas cuyos genes parecen estar asociados. La única proteína que parece estar apartada del grupo es el receptor de vitamina D, que no muestra ninguna interacción con las otras proteínas, aunque más adelante se abordará con mayor detalle el análisis de este resultado. Por otra parte, un elemento que resulta bastante interesante es la posición de IFN- γ dentro de la red. Esta posición es

central y además es el elemento con más interacciones directas fuertes entre distintos elementos, entre los que se encuentra TGF- β 1, TNF- α , IL-18, TYK2, IL-12B e IL-4R. Similar a esta observación, encontramos a la proteína TYK2, que tiene cinco interacciones directas, en este caso con IFN- γ , CCR5, IL-1B, IL-12B e IL-4R. El IFN- γ tiene un papel fundamental en el control de parásitos intracelulares, entre los que se encuentra *T. cruzi* (153). Esto se debe fundamentalmente a que coordina tanto respuesta inmune innata como respuesta inmune adaptativa tipo Th1, que para el caso de *T. cruzi*, es esencial para la eliminación parasitaria (2, 5). Teniendo en cuenta su posición central dentro de la red de interacción determinada por STRING, es posible pensar que polimorfismos ubicados en este gen puedan alterar la respuesta inmune. En el caso particular de estudios en enfermedad de Chagas, el polimorfismo rs2460561 fue analizado en población colombiana encontrando una asociación estadísticamente significativa a riesgo de infección por parte del parásito del alelo rs2430561*T (73). Este SNP en particular está localizado en un sitio de unión del factor NF- κ B (157) y se ha observado que el alelo rs2430561*T estaba asociado a una mayor producción de IFN- γ (158, 159), lo que favorecería una rápida y más eficiente eliminación del parásito (73). No obstante, como se mencionaba, otro elemento central es TYK2. Se ha visto que esta quinasa es esencial para la respuesta inmune y para el control de producción de citoquinas pro-inflamatorias (125, 126, 128), entre las que se encuentra IFN- γ . Es bastante llamativo este eje central ya que favorece el planteamiento de que la respuesta inmune de tipo inflamatorio intensa, ayuda en el proceso de detección y eliminación parasitaria, previniendo el desarrollo de síntomas complicados crónicos como la cardiomiopatía Chagásica crónica. No obstante una respuesta inflamatoria más débil en fase aguda de la enfermedad puede favorecer la persistencia que lleve a un escenario de inmunopatología, en donde el equilibrio de la respuesta inmune inflamatoria con la respuesta inmune

reguladora o antiinflamatoria se pierda en la fase crónica debido a la persistencia por parte del parásito, trayendo como consecuencia una respuesta aún más aguda y poco controlada que dé lugar a daños en los tejidos cardiacos.

Continuando con el análisis anterior, es importante recordar que de acuerdo a nuestra evidencia, hay genes que por separado parecen influir el riesgo de infección y genes que influyen el riesgo de desarrollo de cardiomiopatía Chagásica crónica. Es por esto que se ha decidido hacer una división, y realizar dos análisis diferentes utilizando STRING, en el primero agrupando los elementos asociados a riesgo de infección (**Figura 13**), y por otro lado los genes asociados a riesgo de cardiomiopatía Chagásica crónica (**Figura 14**).

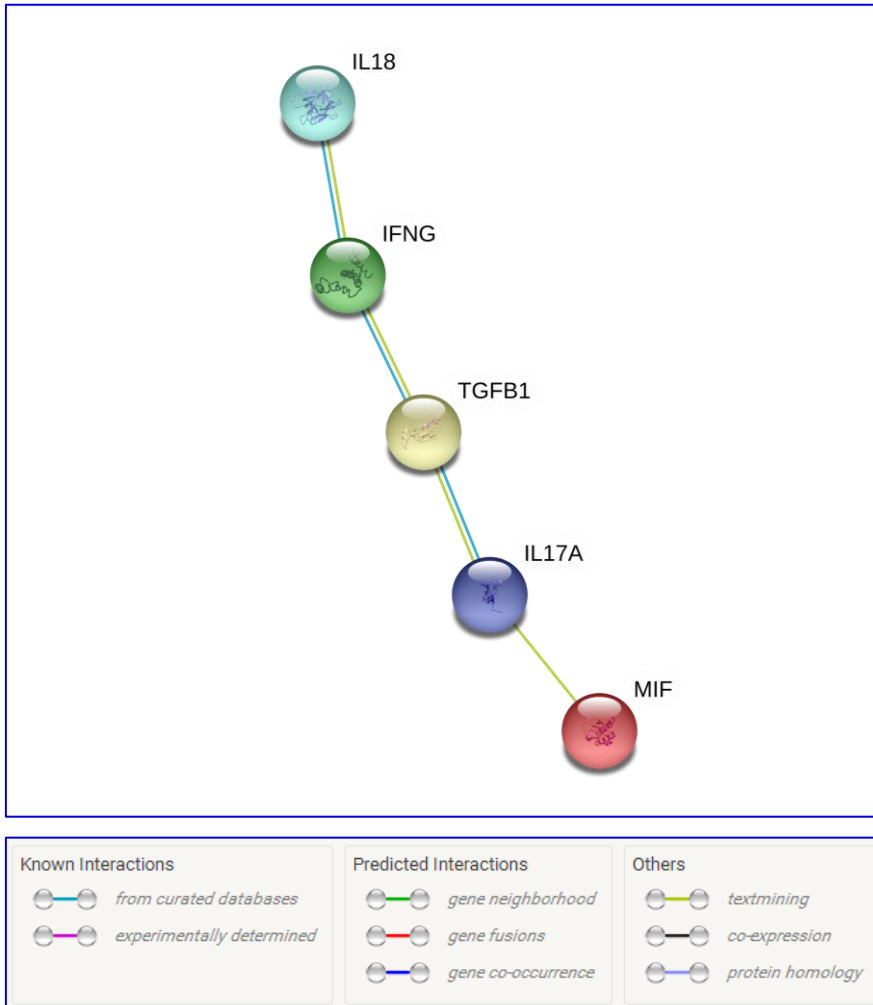


Figura 13. Red de interacciones entre los distintos productos de los genes evaluados en población colombiana que están asociados a infección determinada por STRING V10.

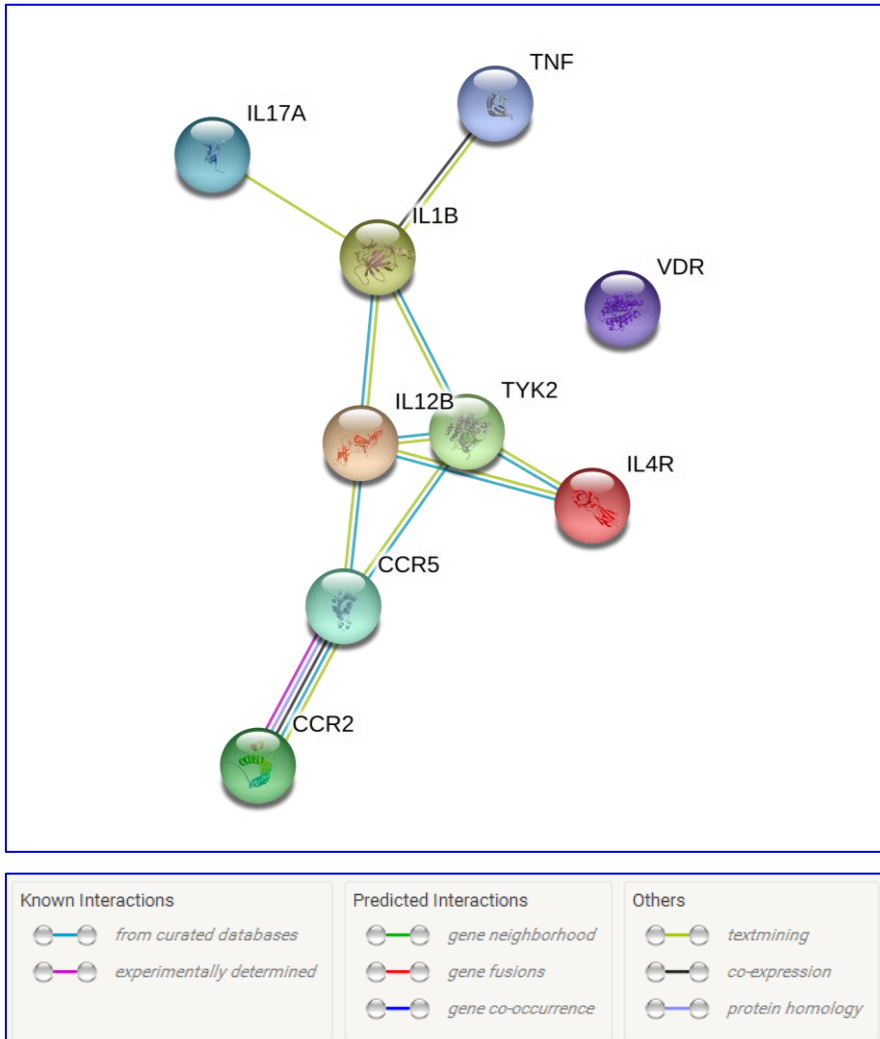


Figura 14. Red de interacciones entre los distintos productos de los genes evaluados en población colombiana que están asociados a desarrollo de cardiomiopatía Chagásica crónica determinada por STRING V10.

En el primer análisis observamos como la red se muestra de manera lineal, sin embargo vemos que existen interacciones fuertes tales como IFN- γ e IL-18, en donde como ya se había mencionado antes, IL-18 potencia la producción de la primera en respuesta a parásitos intracelulares (102, 104), ayudando en consecuencia al control de la infección y eliminando los parásitos de los individuos evitando de acuerdo a nuestra evidencia el avance de la infección. Por otro lado, está TGF- β 1, un factor que está involucrado en la inhibición de distintas citoquinas pro-inflamatorias, entre las que se encuentra IFN- γ (160). En el momento en que se analizaron los polimorfismos localizados en el gen *TGFBI*, se halló que los pacientes con cardiomiopatía Chagásica crónica tenían altos niveles de este factor (161), lo que podía explicar que al inhibir la producción de IFN- γ se favoreciera la infección generando como consecuencia una persistencia parasitaria que llevara al desarrollo de los síntomas cardiacos severos. No obstante, de acuerdo a la evidencia que se obtuvo en población colombiana, este gen parecía influir en el riesgo a infección. Es posible que de manera similar, este gen influyera directamente sobre la respuesta inmune en etapas tempranas de la infección, alterando los niveles de citoquinas pro-inflamatorias, entre estas IFN- γ , favoreciendo la expansión parasitaria lo que conlleva al paso a una respuesta inmune adaptativa donde aparecen con el tiempo anticuerpos anti-*T. cruzi*. Por otra parte, este mismo factor, TGF- β 1, se ha caracterizado junto con IL-6 como un potenciador de la producción de IL-17A (162). Este hallazgo es importante, teniendo en cuenta, como se ha descrito que IL-17A juega un papel esencial en la respuesta anti-parasitaria. Esto podría hacer pensar que TGF- β 1 puede tener un papel importante en el equilibrio de la respuesta inmune ante *T. cruzi*, y que podría ser un eje central entre un respuesta antiparasitaria adecuada junto con una regulación del ambiente pro-inflamatorio que controle dicha respuesta y evite la aparición de daños ocasionados por el mismo sistema inmune. Es por esto que merece la pena

desde un punto de vista inmunogenético estudiar más a fondo las posibles implicaciones de las variantes localizadas en el gen *TGFBI*, no solo en relación con su papel en el riesgo de infección sino también en un análisis detallado en una cohorte de pacientes con diferentes grados de severidad de cardiomiopatía, para confirmar o descartar un posible papel de este factor en el equilibrio de la respuesta inmune.

En esta red de interacción se ve la molécula MIF unida por una interacción leve (solo basada en textmining según STRING) (**Figura 13**). Sin embargo, ésta es una citoquina producida por células T activadas, macrófagos y la glándula pituitaria, y según evidencia experimental, es esencial para la respuesta inmune ante la infección por *T. cruzi* (163). Modelos experimentales han mostrado que este factor es esencial para la producción de otros elementos pro-inflamatorios tales como IL-18, IFN- γ e IL-4 (163). De acuerdo al hallazgo en donde el polimorfismo analizado estaba asociado a riesgo de infección, es posible que el accionar de MIF, al igual que IL-18 e IFN- γ sea en una fase temprana de la infección, controlando la invasión de parásitos y evitando así las consecuencias tardías de la enfermedad de Chagas.

Por otro lado, en el segundo análisis realizado con los genes relacionados con desarrollo diferencial de cardiomiopatía Chagásica crónica en población colombiana, vemos como destacan dos elementos centrales en esta red de interacción, IL-12 β y TYK2 (**Figura 14**). IL-12 es una citoquina inmuno-moduladora, que induce la producción de factores pro-inflamatorios tales como IFN- γ , potencia la diferenciación de células tipo Th1 y forma un vínculo entre respuesta innata y adaptativa (164). A su vez, TYK2 es una quinasa involucrada en la transducción de señales de interferones tipo I, y responde a citoquinas entre las que se encuentra IL-12 (123). Debido a su posicionamiento central dentro de la red de

interacciones, podemos observar que ambas juegan un papel importante dentro de la respuesta inmune a *T. cruzi*.

En esta misma red vemos la interacción entre ambas, IL-12 β y TYK2, tanto con CCR5 como con IL-1 β (**Figura 14**). En ambos casos, se habla de dos elementos pro-inflamatorios implicados en la respuesta inmune a parásitos intracelulares (165, 166). Al analizar las variantes localizadas en estos genes, en el caso de CCR5 (junto con CCR2) mostraron una asociación estadísticamente significativa a riesgo de avance de la enfermedad (y en este caso con estudio de replicación) (76, 77). La posibilidad de que estos genes alteren la intensidad de la respuesta inmune puede ser la clave para entender cómo se originan las complicaciones crónicas, y con esta información determinar las posibles dianas terapéuticas en un futuro.

Para el caso de TNF- α , vemos que este en la red se asocia con IL-1 β (**Figura 14**). TNF- α , es una citoquina pro-inflamatoria esencial para la respuesta inmune a *T. cruzi* (88). En este caso, su influencia en el desarrollo de cardiomiopatía Chagásica crónica en los individuos analizados puede dar una idea del comportamiento de un ambiente inflamatorio en el cual la no eliminación del parásito podría contribuir a la aparición de daños cardiacos. Este resultado en particular ha sido replicado en diferentes poblaciones (82, 88, 167), confirmando que las variantes alélicas pueden influir efectivamente en la susceptibilidad de los individuos infectados a desarrollar síntomas severos con el tiempo.

Un resultado poco satisfactorio fue observar que según la herramienta STRING, VDR parecía no estar conectado a ninguno de los elementos de la red, tanto en el análisis completo (**Figura 12**) como en el análisis particular de los genes asociados a riesgo de desarrollo de cardiomiopatía

Chagásica crónica (**Figura 14**). No obstante, es necesario recordar que en este caso específico, la vitamina D juega un papel crucial en el control de la respuesta inmune, regulando la respuesta inflamatoria (118). A pesar de no tener una conexión directa mostrada por STRING, es claro el papel que tiene las variantes génicas de *VDR* sobre la susceptibilidad a cardiomiopatía Chagásica crónica, pues dependiendo de su capacidad de unirse y reaccionar ante la vitamina D, la respuesta inmune puede verse afectada, ya que la intensidad de la inflamación puede ser alterada por efecto de la vitamina D, y una reactividad diferencial del receptor puede influir directamente, generando un efecto inmediato que podría favorecer una expansión parasitaria trayendo como consecuencia los síntomas crónicos adversos en los pacientes analizados.

La cardiomiopatía Chagásica crónica es un proceso complejo que toma hasta décadas en aparecer en los individuos infectados (3), razón por la cual se creyó durante un tiempo que era un proceso autoinmune (14). No obstante, según las evidencias actuales se cree que la persistencia parasitaria lleva a un escenario en el que el balance de la respuesta inmune se pierde, generando un proceso inflamatorio no controlado y ocasionando finalmente una patología inmune (9, 10, 14). Dentro de este proceso puede suceder que la eficiencia de la respuesta inmune dependa en gran medida de la intensidad y el momento en que se presente. Es posible que una respuesta tenue que no elimine completamente la infección, ocasione un proceso patológico en tejidos adyacentes a la infección, en este caso en particular tejidos cardíacos.

Los hallazgos del presente trabajo permiten ir tejiendo una red de diversos genes y factores genéticos que permitirían explicar las bases de la susceptibilidad tanto a infección como a desarrollo de cardiomiopatía Chagásica crónica en pacientes de área endémica colombiana. No

obstante, como se indicaba previamente, parte de los resultados de la presente tesis doctoral necesitan estudios de confirmación. En primer lugar, ensayos funcionales que permitan determinar si los niveles de expresión de las proteínas codificadas por los genes analizados se ven alterados por los polimorfismos estudiados y que esto pudiera explicar las diferencias observadas en las características de los individuos de la población de estudio. Por otra parte, es necesario hacer estudios de replicación, en distintas poblaciones endémicas para ver si las asociaciones observadas son específicas de población colombiana o si pueden afectar individuos en diferentes poblaciones.

8.5. Análisis de genes asociados a infección y/o fenotipos severos de la enfermedad de Chagas en resultados reportados en población endémica brasileña

Varios estudios de asociación que evalúan el papel de distintos genes en el riesgo de infección y/o desarrollo de fenotipos crónicos severos de la enfermedad, es decir cardiomiopatía Chagásica crónica y forma digestiva, han sido llevados a cabo en individuos provenientes de diferentes poblaciones endémicas. Una población en la que han sido ampliamente analizadas las bases genéticas de la enfermedad de Chagas es la población brasileña. De estos estudios se destacan los análisis en genes tales como *TNFA*, *IL10*, *IL18*, *CCR2* y *CCR5*, que también han sido analizados en población colombiana.

El caso del gen *TNFA* es interesante. Como se ha mencionado antes, en población colombiana los SNP rs179964 y rs1800629 fueron estudiados, encontrándose una asociación estadísticamente significativa con el riesgo de desarrollo de cardiomiopatía (72). Este gen ya había sido evaluado en población brasileña, en donde varios microsatélites estaban asociados a formas sintomáticas de Chagas (86). Un estudio evaluó pacientes brasileños con distintos grados de avance de cardiomiopatía genotipando el microsatélite *TNFA2* y el polimorfismo rs1800629; aunque no se encontró una asociación significativa del SNP, si se evidenció que la presencia o ausencia del microsatélite *TNFA2* estaba directamente relacionada con una tasa de supervivencia menor en los individuos afectados (82). Otro trabajo en individuos brasileños analizó la variante rs361525, hallándose que dicha variante estaba asociada a riesgo de

infección (88). A pesar de las diferencias, si se comparan los resultados hallados en individuos colombianos con los hallados en individuos brasileños, se evidencia que el gen de *TNFA* podría ser considerado como un biomarcador, no solo de riesgo de infección, sino de avance de síntomas severos, por lo cual la realización de estudios más detallados, tanto de replicación como estudios funcionales, serían importantes para confirmar el papel de este gen en la enfermedad de Chagas.

El gen *IL10* codifica para la IL-10, una interleuquina anti-inflamatoria que promueve la diferenciación de la respuesta inmune innata en una respuesta inmune de tipo Th2. En población endémica colombiana, los polimorfismos rs1800896, rs1800871 y rs1800872 fueron analizados no encontrando ninguna asociación significativa (74), a diferencia de lo observado en población brasileña, donde la variante rs1800896 está asociada a un menor riesgo de desarrollar cardiomiopatía crónica (87). Las diferencias en los resultados entre ambos estudios puede deberse a la divergencia del tamaño muestral que pudo alterar la potencia estadística de los estudios, así como la distinta estructura genética de los individuos. No obstante, el gen de *IL10* podría ser de gran interés, por lo que sería recomendable confirmar los resultados en una tercera población endémica, mediante un estudio de replicación y adicionalmente ensayos funcionales.

Otro gen analizado en individuos de Brasil y Colombia es *IL18* (90, 149). En el primer estudio, el cual fue realizado en población brasileña se encontró que la variante rs2043055 estaba asociada a la aparición de cardiomiopatía Chagásica crónica (90). En nuestro caso con población colombiana, esta misma variante parece estar asociada a riesgo de infección por parte de *T. cruzi*, aunque en un análisis más detallado se mostró que dicha asociación dependía de otro polimorfismo, el rs360719

(149). Estos resultados muestran el papel fundamental que puede tener la IL-18 en la defensa de los individuos ante la infección, ya que puede influir en la fase inicial de la infección controlándola y evitando el avance de la enfermedad, impidiendo tanto la aparición de anticuerpos, así como de síntomas severos relacionados a la persistencia parasitaria.

Los receptores de quimiocinas constituyen una parte importante en la respuesta inmune. En el marco de la enfermedad de Chagas, las variantes polimórficas localizadas en los genes *CCR2* y *CCR5* fueron analizadas en población colombiana, encontrando que los polimorfismos rs1799864 de *CCR2*, los polimorfismos rs1800023, rs1800024 y rs2734648 de *CCR5* parecen influir en el riesgo de aparición de los grados más severos en los pacientes con cardiomiopatía (76, 77). En el caso de individuos brasileños, el SNP rs1799988 estaba asociado estadísticamente a un mayor grado de disfunción ventricular (91), hallazgo de suma importancia, ya que en ambos casos se ve como las variantes localizadas en estos genes afectan la sintomatología de los individuos infectados. Debido a esto, *CCR5* puede ser tomado como referencia para futuros marcadores de riesgo de avance de complicaciones cardíacas, requiriéndose estudios que confirmen esta afirmación.

Por otra parte, hay genes que han sido estudiados en población brasileña que por el momento no han sido analizados en población colombiana, y en algunos casos, en ninguna otra población endémica; entre esos genes encontramos *BATI* (83), *CCL2/MCP1* (84), *LTA* (85), *CTLA4* (89), *CXCL9* y *CXCL10* (91), y *MBL2* (92). Otros genes de gran interés, pero de gran complejidad, que han sido analizados en Brasil y otros países son los genes del HLA (81) y del sistema KIR (éstos en Brasil únicamente) (69). Todos estos genes juegan papeles fundamentales en la inmunidad de la enfermedad de Chagas, lo cual puede promover la realización estudios

de replicación en población colombiana, demostrando que, este estudio debe complementarse con un esfuerzo mancomunado entre distintos grupos de investigación especialistas en el tema y de diferentes países, creándose así una red de trabajo de Chagas, que permita establecer qué genes pueden ser usados como biomarcadores de riesgo en esta enfermedad.

8.6. Comparación de los resultados obtenidos en estudios de susceptibilidad genética de otras enfermedades infecciosas con enfermedad de Chagas

En el marco de otras enfermedades infecciosas, el papel de las variantes polimórficas de genes de respuesta inmune/inflamatoria ha sido analizado para observar si éstas pueden estar involucradas en el riesgo de infección y/o la aparición de diversos síntomas severos de las enfermedades (18, 22, 23). Los genes estudiados en la presente tesis son parte fundamental de la respuesta inmune, y al igual que en Chagas, son esenciales para la eliminación de distintas agentes patógenos, razón por la cual, es posible hacer una comparación entre los resultados obtenidos en el presente estudio con otras enfermedades infecciosas. Dada la gran variedad de enfermedades infecciosas, nos enfocaremos principalmente en enfermedades causadas por parásitos tripanosomátidos, es decir, leishmaniasis y malaria.

En primer lugar, se ha descrito que IL-17A es esencial en el control y la eliminación de las infecciones causadas por distintas especies del género *Leishmania* (96, 97). Hasta el momento de la escritura de esta tesis, no hay estudios en los que específicamente se estudie la asociación de las variantes genéticas del gen de *IL17A* con infección por *Leishmania* y/o riesgo de desarrollo de fenotipos graves de leishmaniasis. Sería bastante interesante realizar estudios de asociación de polimorfismos localizados en el locus de *IL17A* en pacientes con leishmaniasis, para comparar los resultados y determinar si estas variantes pueden alterar la susceptibilidad

ante la infección, como la de aparición de síntomas severos de la enfermedad.

Por otra parte, en el caso de malaria, IL-17A juega un papel importante en la respuesta inmune frente al parásito (98). En un estudio se analizaron las variantes de los genes *IL17A*, *IL17F*, e *IL17RA* en dos cohortes africanas de pacientes infectados con *Plasmodium falciparum*. De acuerdo a los resultados, se encontró que varios polimorfismos localizados en los genes de *IL17F* e *IL17RA* estaban asociados al fenotipo severo de malaria cerebral, mientras que por otra parte, no hubo ninguna asociación estadísticamente significativa de los SNPs del gen de *IL17A* a malaria cerebral (168). A pesar de que los resultados de ese estudio difieren al nuestro, ya que no se encuentra ninguna asociación con las variantes del gen *IL17A*, mientras que en nuestro caso el polimorfismo rs8193036 parece influir en el riesgo de infección y aparición de cardiomiopatía (148), se muestra la relación de las variantes polimórficas de los genes de la vía de la IL-17 con el desarrollo de fenotipos severos en enfermedades parasitarias. Sería interesante analizar si para nuestro caso, las variantes de los genes *IL17F* e *IL17RA* pueden también estar asociadas no solo a riesgo de infección sino a riesgo de desarrollo de cardiomiopatía crónica Chagásica, lo que nos permitiría tener un panorama más completo de esta vía.

Para el caso de la IL-18, distintas variantes polimórficas localizados en el gen de *IL18* han sido analizadas en pacientes infectados con *Leishmania* y *Plasmodium*. Un primer estudio analizó diferentes SNPs localizados en el locus de *IL18* (rs1946519, rs187238 y rs549908), revelando que el alelo rs1946519*T estaba débilmente asociado a resistencia a leishmaniasis visceral en un grupo de individuos iraníes (108). Este resultado revela que, de manera similar a nuestro estudio, las variantes polimórficas

localizadas en *IL18* pueden influir efectivamente en el riesgo de infección por parte de un patógeno protozoario intracelular. No obstante, este trabajo posee una potencia estadística considerablemente menor y la población analizada es muy diferente a la población objeto de nuestro estudio (108), por lo tanto, sería altamente recomendable realizar estudios de confirmación.

Por otro lado, en malaria las variantes rs187238 y rs1946518 de *IL18* fueron analizadas en un grupo de pacientes con malaria cerebral en Kenia (107). De acuerdo a este trabajo, el genotipo homocigoto del alelo rs1946518*A estaba asociado a un menor riesgo de desarrollar malaria cerebral mientras que por otro lado, la combinación alélica de rs187238*G y rs1946518*C estaba asociada a un mayor riesgo de aparición del fenotipo severo de la enfermedad (107). En nuestro estudio, la frecuencia del genotipo homocigoto de rs1946518*A fue más alta en los individuos asintomáticos y adicionalmente, la frecuencia haplotípica de la combinación alélica rs187238*G|rs1946518*C estuvo incrementada en los individuos con cardiomiopatía crónica Chagásica (149), mostrando cierto grado de similitud al resultado obtenido en el estudio de malaria. Sin embargo, para ambos casos no se alcanzó nivel de significancia estadística, por lo que se hace necesario hacer estudios de replicación con mayor tamaño de población que permitan establecer si dichas variantes pueden influir o no en la aparición de síntomas severos de la enfermedad.

El *VDR* es otro gen que ha sido estudiado, en el marco de la asociación genética a riesgo de infección y/o severidad en diferentes patologías infecciosas. Como se ha mencionado anteriormente, la vitamina D es un componente esencial en los distintos mecanismos de respuesta inmune, induciendo procesos claves tales como la fagocitosis, la producción de péptidos antimicrobianos y activando la respuesta adaptativa tipo Th2

(118, 119), lo cual ha llevado a que el papel de este compuesto sea estudiado en diferentes enfermedades infecciosas (119, 122). En malaria, dos estudios hallaron que esta molécula interviene en la respuesta inmune (169, 170); el primer análisis apuntó que la vitamina D ayuda a evitar la aparición de síntomas graves tales como malaria cerebral (169) y el segundo estudio mostró que la insuficiencia de vitamina D en niños estaba directamente relacionada con la aparición de este fenotipo de la enfermedad (170). Un tercer estudio realizado en una cohorte brasileña de pacientes infectados con *Plasmodium vivax*, analizó la posible relación de tres polimorfismos del gen *VDR* (rs10735810, rs731236 y rs1544410) con la severidad de la malaria encontrando que dos polimorfismos (rs731236 y rs1544410) influían en los niveles de gametocitemia (171). Cabe recordar que las variantes rs731236 y rs1544410 afectan los niveles de expresión de *VDR* (143, 144). En nuestro caso específico con la enfermedad de Chagas, se observó que la variante analizada que mostró un nivel de asociación estadísticamente significativo fue la rs2228570 (151), que también influye el nivel de expresión del gen (141, 142). Esto permite deducir que, tanto para malaria como en enfermedad de Chagas, los niveles de expresión del receptor, y por ende la capacidad de las distintas células de responder a la vitamina D, parecen ser determinantes en el proceso de eliminación parasitaria, lo cual en última estancia favorece la no aparición de síntomas asociados a complicaciones de dichas enfermedades.

En leishmaniasis, el rol de la vitamina D parece ser el de disminuir la eliminación de los parásitos en individuos infectados (172, 173). En una revisión amplia, se ha visto que hasta el momento no se han llevado a cabo estudios de asociación genética del gen *VDR* con riesgo de infección por parásitos del género *Leishmania* y/o fenotipos severos de leishmaniasis. Este podría ser un campo interesante para investigación, ya

que podría dar resultados importantes, con los cuales sería posible establecer un cuadro comparativo donde se analice la influencia de los polimorfismos de *VDR* en el avance de la enfermedad.

Finalmente, otro gen analizado en la presente tesis doctoral fue *TYK2*. En enfermedades parasitarias, un modelo experimental mostró que *TYK2* es fundamental para la respuesta ante la infección por *Leishmania major*; ratones knockout para *TYK2* desarrollaban lesiones epiteliales más grandes y niveles de parasitemia mayor en comparación con ratones de tipo silvestre (174). No obstante, estudios de asociación genética en los que se evalúen los SNPs localizados en el gen de *TYK2* todavía no han sido llevados a cabo, razón por la cual es primordial la realización de nuevas investigaciones que incluyan estudios de asociaciones genéticas del gen *TYK2* en enfermedades parasitarias, tanto en leishmaniasis como en malaria, lo cual permitiría no solo ampliar nuestro conocimiento y comprensión sobre las bases genéticas en diferentes enfermedades infecciosas, sino que también permitiría ampliar el conocimiento sobre la influencia de la quinasa *TYK2* en la respuesta inmune frente patógenos protozoarios específicamente.

Por todo lo planteado anteriormente, los diferentes genes analizados parecen tener un papel fundamental en la efectividad de la respuesta inmune ante la infección, no solo por *T. cruzi*, sino por otros patógenos protozoarios. Es importante aclarar que la influencia de los polimorfismos localizados en estos genes ha sido analizada en otras enfermedades infecciosas tales como hepatitis B y C (109-112, 175), tuberculosis (176-178) y lepra (179), hallando distintos grados de asociación tanto a riesgo de infección como a gravedad en este tipo de patologías. Es por esto que con los resultados presentados en esta tesis y con análisis futuros, no solo en Chagas sino en diferentes enfermedades, se podrían hacer estudios

comparativos, estableciendo qué bases genéticas son comunes entre distintas enfermedades infecciosas.



9. Perspectivas

A lo largo del estudio de las bases genéticas de la enfermedad de Chagas, los genes analizados en trabajos previos como los que se han estudiado en la presente tesis doctoral muestran que efectivamente las variantes genéticas de vías de respuesta inmune/inflamatoria parecen influir en la susceptibilidad de los individuos de población colombiana, tanto a riesgo de infección como de aparición y desarrollo de complicaciones como cardiomiopatía Chagásica crónica. Este panorama abre un sinfín de posibilidades que permiten ir entendiendo mejor cómo la respuesta inflamatoria puede verse afectada y cómo puede intervenir en el establecimiento de la infección y el desarrollo de complicaciones.

Es por esto que se deben plantear objetivos concretos de cara al futuro del estudio de marcadores de riesgo de la enfermedad de Chagas. En primer lugar, dada la gran extensión de la zona endémica de la enfermedad, y de la diversidad de los individuos que habitan en esta región (3, 5), un primer paso es intentar establecer redes colaborativas en el tema, entre grupos de investigación de distintos países endémicos. Esto permitiría tener grupos de individuos de diferentes zonas con los cuales se podrían realizar estudios de replicación, tanto de los genes asociados en la presente tesis como genes que han sido analizados en otros trabajos previos. Adicionalmente, con grupos de individuos más grandes se podría plantear la posibilidad de realizar un estudio de genoma completo (GWAS), ya que como se ha mencionado anteriormente, hasta la fecha solo existe un GWAS en pacientes de Chagas, en el cual no se obtuvieron resultados de asociación a nivel genómico (56). Un nuevo GWAS, con grupos más grandes de pacientes, permitiría aumentar las posibilidades de encontrar

asociaciones a nivel genómico, permitiendo establecer qué factores genéticos son claves en la susceptibilidad tanto a infección por parte del parásito, como del desarrollo de síntomas severos en los individuos enfermos. Este análisis además permitiría abrir la posibilidad de establecer un nuevo campo de estudio, y realizar meta-análisis con GWAS de otras enfermedades infecciosas, lo cual se conoce como meta-GWAS. Los meta-GWAS han sido realizados en el contexto de enfermedades autoinmunes, encontrando diferentes genes de riesgo compartido entre distintas patologías (180-185). Dado el creciente conocimiento de genes de susceptibilidad en enfermedades infecciosas, podría ser bastante interesante realizar este tipo de análisis de Chagas con enfermedades parasitarias tales como malaria, donde existen diferentes estudios de GWAS (18, 23).

Adicionalmente, nuevos genes pueden ser analizados para seguir encontrando más asociaciones y poder así completar una red de interacciones que permita tener un mapa detallado de la genética detrás de la enfermedad de Chagas. Herramientas tales como STRING pueden ayudarnos, ya que se pueden buscar otros genes relacionados además de los ya analizados, que permitan realizar futuros estudios de genes candidatos con nuevas variantes y poder completar el mapa de susceptibilidad de la enfermedad de Chagas (**Figura 15**). De igual manera, es importante resaltar que los nuevos hallazgos que puedan salir de estos nuevos estudios de genes candidatos, requerirían de estudios de replicación para su confirmación.

Por otra parte, un nuevo campo de estudio que se derivaría de los resultados hasta ahora obtenidos es el de análisis funcionales, ya que para entender de manera adecuada los factores de riesgo en la enfermedad de Chagas, es necesario el abordaje de nuevos estudios de este tipo. Uno de

ellos es el análisis de expresión de genes, para lo cual es necesario contar con un banco de muestras adecuado donde los pacientes estén bien caracterizados a nivel clínico. Una plataforma que se podría utilizar es la RNA-seq (186), la cual permite elaborar un completo perfil de transcripción génica de las muestras analizadas, que para el caso de los distintos fenotipos de la enfermedad de Chagas (Asintomático, cardiomiopatía Chagásica crónica, megacolon, etc.) permitiría elaborar un completo perfil de transcripción de genes de respuesta inmune/inflamatoria, que complementen los resultados obtenidos en estudios tanto de genes candidatos como los estudios de GWAS. También se puede elaborar perfiles serológicos de los individuos que permitan analizar los niveles de las diferentes citoquinas involucradas en la respuesta inmune.

Finalmente, otro elemento que podría ser interesante a futuro es realizar un estudio de seguimiento en donde a los pacientes se les realice un análisis detallado a lo largo de varios años que permita entender de mejor manera el proceso de avance de la enfermedad, estudiando el cambio de los perfiles de expresión de los genes de la respuesta inmune inflamatoria, haciendo un especial énfasis en los individuos seronegativos y los pacientes asintomáticos, con los que se pueda establecer si efectivamente las variantes genéticas asociadas realmente pueden servir como biomarcadores de riesgo para infección y/o desarrollo de cardiomiopatía Chagásica crónica. En la **Figura 16** se muestra un esquema de lo mencionado anteriormente.

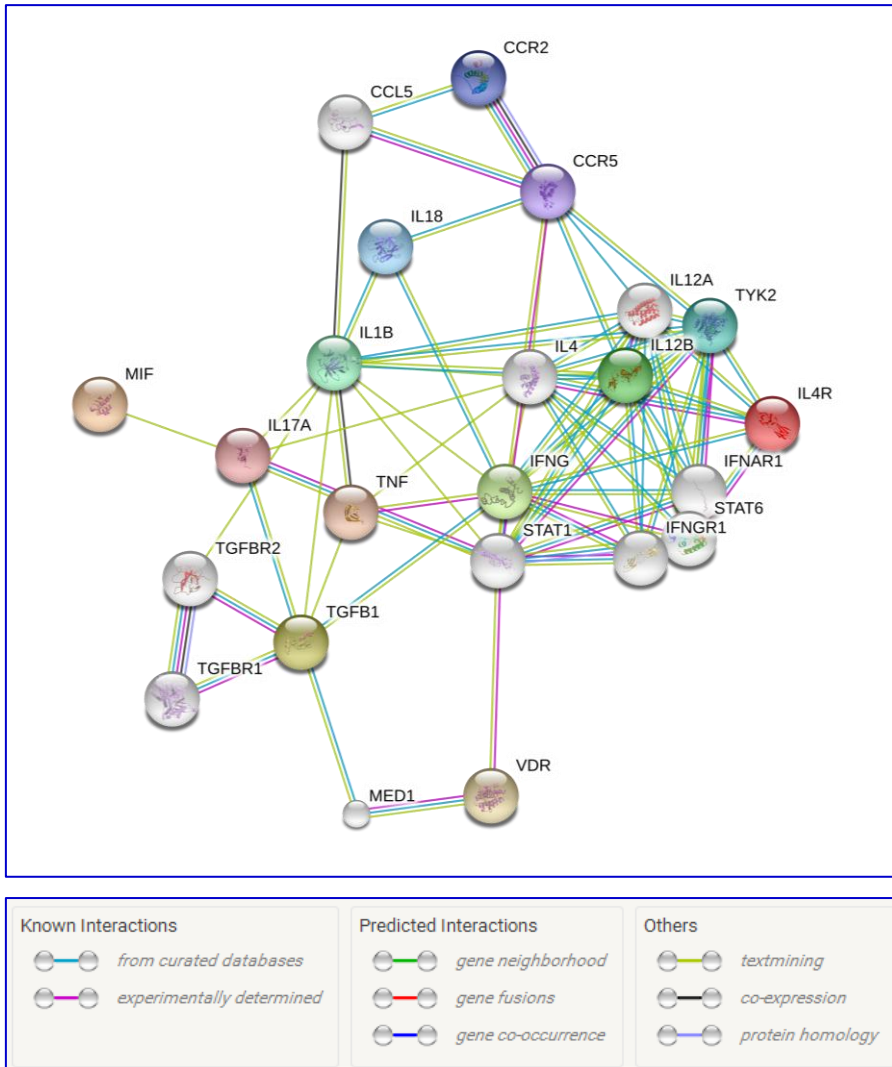


Figura 15. Red de interacciones entre los distintos productos de los genes evaluados en población colombiana que están asociados tanto a riesgo de infección como de desarrollo de cardiomiopatía Chagásica crónica determinada por STRING V10. Los círculos blancos corresponden a la segunda capa de interacciones predicha por la herramienta STRING que podrían ser futuros genes candidatos a analizar.

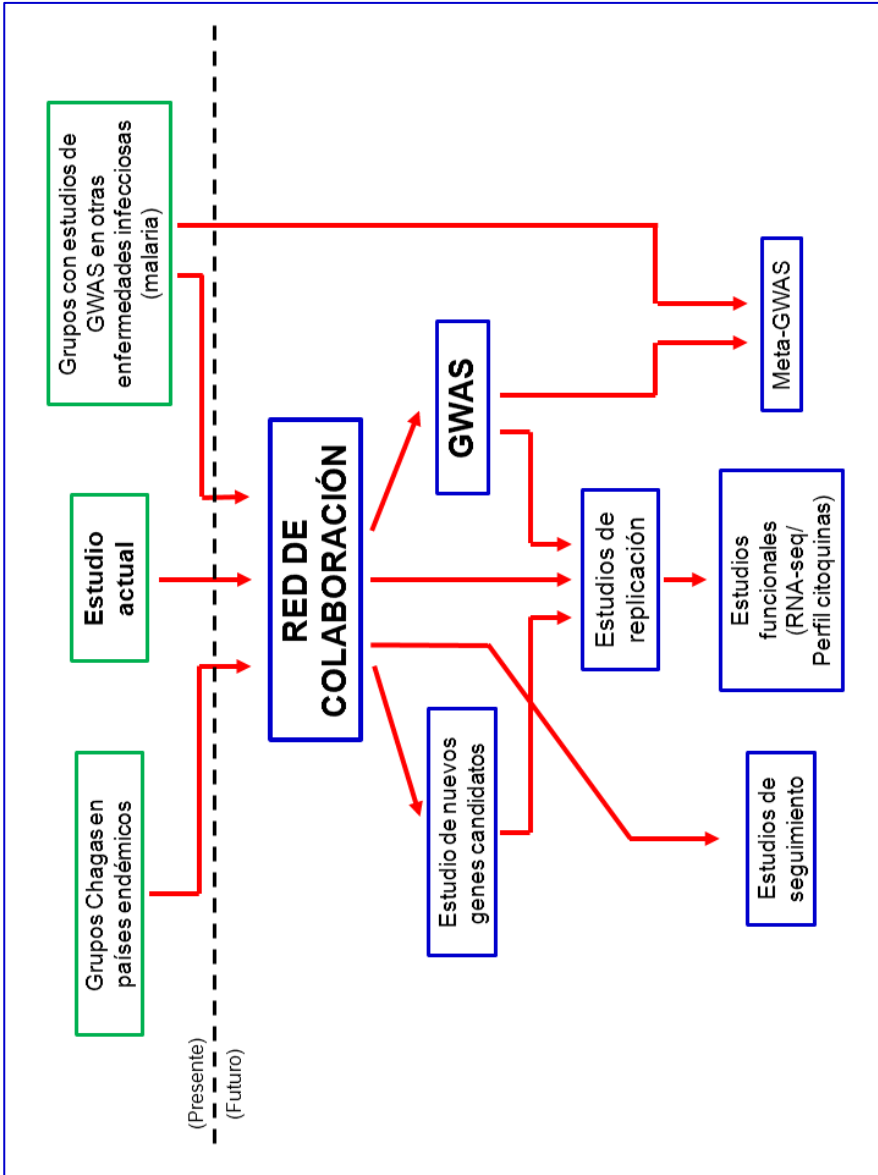


Figura 16. Esquema de la propuesta del futuro del estudio de factores de riesgo de la enfermedad de Chagas, en donde se recopilan los resultados de presente estudio para establecer una red de colaboración que permitan profundizar en el conocimiento de la enfermedad.

10. Conclusiones

10.1. En el presente trabajo se identificó por primera vez que las variantes polimórficas localizadas en dos genes, *IL17A* e *IL18*, parecen estar asociadas con una susceptibilidad diferencial a riesgo de infección por *T. cruzi* en población colombiana.

10.2. En esta tesis doctoral se identificó de igual manera por primera vez, que los polimorfismos localizados en los genes *VDR* y *TYK2*, parecen intervenir en el riesgo de aparición de complicaciones crónicas (cardiomiopatía Chagásica crónica) en población endémica colombiana.

10.3. La evidencia presentada en este estudio parece indicar, que las variantes genéticas implicadas en la respuesta inmune inflamatoria influyen en el riesgo de establecimiento de la infección, persistencia parasitaria y finalmente desarrollo de cardiomiopatía Chagásica crónica, posiblemente basado en que una expresión diferencial de citoquinas pro-inflamatorias, afectan directamente la capacidad del organismo de los individuos de eliminar completamente los parásitos.

10.4. Este trabajo reúne por primera vez, todos los hallazgos realizados en cuanto a genes de susceptibilidad para riesgo de infección y/o desarrollo de cardiomiopatía Chagásica crónica en individuos de Colombia, mostrando una compleja red de interacción, donde los genes *IFNG*, *IL18*, *TYK2*, *IL4R*, *IL12B*, *TNFA*, *CCR5* y *TGFBI* forman un nodo central, indicando la importancia de variantes alélicas de estos genes en la protección a infección y desarrollo de cardiomiopatía en los individuos de la cohorte analizada.

10.5. Los resultados de la presente tesis doctoral, se pueden considerar como un pilar importante en el estudio de las bases genéticas de la enfermedad de Chagas, que permitirá abordar nuevas perspectivas de análisis de factores que influyan tanto en la evaluación del riesgo de infección por parte de *T. cruzi* así como en el pronóstico de pacientes actualmente infectados.

11. Referencias

1. Coura JR, Borges-Pereira J. Chagas disease: 100 years after its discovery. A systemic review. *Acta tropica*. 2010;115(1-2):5-13.
 2. Junqueira C, Caetano B, Bartholomeu DC, Melo MB, Ropert C, Rodrigues MM, et al. The endless race between *Trypanosoma cruzi* and host immunity: lessons for and beyond Chagas disease. *Expert Rev Mol Med*. 2010;12:e29.
 3. Bern C. Chagas' Disease. *N Engl J Med*. 2015;373(5):456-66.
 4. Chagas disease in Latin America: an epidemiological update based on 2010 estimates. *Wkly Epidemiol Rec*. 2015;90(6):33-43.
 5. Rassi A, Jr., Rassi A, Marin-Neto JA. Chagas disease. *Lancet*. 2010;375(9723):1388-402.
 6. Andrade DV, Gollob KJ, Dutra WO. Acute chagas disease: new global challenges for an old neglected disease. *PLoS Negl Trop Dis*. 2014;8(7):e3010.
 7. Morillo CA, Marin-Neto JA, Avezum A, Sosa-Estani S, Rassi A, Jr., Rosas F, et al. Randomized Trial of Benznidazole for Chronic Chagas' Cardiomyopathy. *N Engl J Med*. 2015;373(14):1295-306.
 8. Pecoul B, Batista C, Stobbaerts E, Ribeiro I, Vilasanjuan R, Gascon J, et al. The BENEFIT Trial: Where Do We Go from Here? *PLoS Negl Trop Dis*. 2016;10(2):e0004343.
 9. Girones N, Fresno M. Etiology of Chagas disease myocarditis: autoimmunity, parasite persistence, or both? *Trends Parasitol*. 2003;19(1):19-22.
 10. Gutierrez FR, Guedes PM, Gazzinelli RT, Silva JS. The role of parasite persistence in pathogenesis of Chagas heart disease. *Parasite Immunol*. 2009;31(11):673-85.
 11. Machado FS, Dutra WO, Esper L, Gollob KJ, Teixeira MM, Factor SM, et al. Current understanding of immunity to *Trypanosoma cruzi* infection and pathogenesis of Chagas disease. *Semin Immunopathol*. 2012;34(6):753-70.
 12. Tarleton RL. CD8+ T cells in *Trypanosoma cruzi* infection. *Semin Immunopathol*. 2015;37(3):233-8.
 13. de Alencar BC, Persechini PM, Haolla FA, de Oliveira G, Silverio JC, Lannes-Vieira J, et al. Perforin and gamma interferon expression are required for CD4+ and CD8+ T-cell-dependent protective immunity against a human parasite, *Trypanosoma cruzi*, elicited by heterologous plasmid DNA prime-recombinant adenovirus 5 boost vaccination. *Infect Immun*. 2009;77(10):4383-95.
-

14. Tarleton RL, Zhang L. Chagas disease etiology: autoimmunity or parasite persistence? *Parasitology today*. 1999;15(3):94-9.
 15. Lederberg J. Infectious history. *Science*. 2000;288(5464):287-93.
 16. Casanova JL, Abel L. The human model: a genetic dissection of immunity to infection in natural conditions. *Nat Rev Immunol*. 2004;4(1):55-66.
 17. Alcais A, Abel L, Casanova JL. Human genetics of infectious diseases: between proof of principle and paradigm. *J Clin Invest*. 2009;119(9):2506-14.
 18. Chapman SJ, Hill AV. Human genetic susceptibility to infectious disease. *Nat Rev Genet*. 2012;13(3):175-88.
 19. Petersen L, Andersen PK, Sorensen TI. Premature death of adult adoptees: analyses of a case-cohort sample. *Genet Epidemiol*. 2005;28(4):376-82.
 20. Petersen L, Andersen PK, Sorensen TI. Genetic influences on incidence and case-fatality of infectious disease. *PLoS One*. 2010;5(5):e10603.
 21. Stead WW, Senner JW, Reddick WT, Lofgren JP. Racial differences in susceptibility to infection by *Mycobacterium tuberculosis*. *N Engl J Med*. 1990;322(7):422-7.
 22. Cooke GS, Hill AV. Genetics of susceptibility to human infectious disease. *Nat Rev Genet*. 2001;2(12):967-77.
 23. Vannberg FO, Chapman SJ, Hill AV. Human genetic susceptibility to intracellular pathogens. *Immunol Rev*. 2011;240(1):105-16.
 24. Frazer KA, Murray SS, Schork NJ, Topol EJ. Human genetic variation and its contribution to complex traits. *Nat Rev Genet*. 2009;10(4):241-51.
 25. Hill AV. Aspects of genetic susceptibility to human infectious diseases. *Annual review of genetics*. 2006;40:469-86.
 26. Venter JC, Adams MD, Myers EW, Li PW, Mural RJ, Sutton GG, et al. The sequence of the human genome. *Science*. 2001;291(5507):1304-51.
 27. Lander ES, Linton LM, Birren B, Nusbaum C, Zody MC, Baldwin J, et al. Initial sequencing and analysis of the human genome. *Nature*. 2001;409(6822):860-921.
 28. Bochud M. Genetics for clinicians: from candidate genes to whole genome scans (technological advances). *Best Pract Res Clin Endocrinol Metab*. 2012;26(2):119-32.
 29. Redon R, Ishikawa S, Fitch KR, Feuk L, Perry GH, Andrews TD, et al. Global variation in copy number in the human genome. *Nature*. 2006;444(7118):444-54.
 30. Cardon LR, Bell JI. Association study designs for complex diseases. *Nat Rev Genet*. 2001;2(2):91-9.
-

31. International HapMap C, Altshuler DM, Gibbs RA, Peltonen L, Altshuler DM, Gibbs RA, et al. Integrating common and rare genetic variation in diverse human populations. *Nature*. 2010;467(7311):52-8.
 32. Genomes Project C, Abecasis GR, Auton A, Brooks LD, DePristo MA, Durbin RM, et al. An integrated map of genetic variation from 1,092 human genomes. *Nature*. 2012;491(7422):56-65.
 33. Newton-Cheh C, Hirschhorn JN. Genetic association studies of complex traits: design and analysis issues. *Mutat Res*. 2005;573(1-2):54-69.
 34. Hirschhorn JN, Daly MJ. Genome-wide association studies for common diseases and complex traits. *Nat Rev Genet*. 2005;6(2):95-108.
 35. Westra HJ, Franke L. From genome to function by studying eQTLs. *Biochim Biophys Acta*. 2014;1842(10):1896-902.
 36. Grundberg E, Small KS, Hedman AK, Nica AC, Buil A, Keildson S, et al. Mapping cis- and trans-regulatory effects across multiple tissues in twins. *Nat Genet*. 2012;44(10):1084-9.
 37. Nica AC, Parts L, Glass D, Nisbet J, Barrett A, Sekowska M, et al. The architecture of gene regulatory variation across multiple human tissues: the MuTHER study. *PLoS Genet*. 2011;7(2):e1002003.
 38. Trynka G, Hunt KA, Bockett NA, Romanos J, Mistry V, Szperl A, et al. Dense genotyping identifies and localizes multiple common and rare variant association signals in celiac disease. *Nat Genet*. 2011;43(12):1193-201.
 39. Westra HJ, Peters MJ, Esko T, Yaghootkar H, Schurmann C, Kettunen J, et al. Systematic identification of trans eQTLs as putative drivers of known disease associations. *Nat Genet*. 2013;45(10):1238-43.
 40. Boyle AP, Hong EL, Hariharan M, Cheng Y, Schaub MA, Kasowski M, et al. Annotation of functional variation in personal genomes using RegulomeDB. *Genome Res*. 2012;22(9):1790-7.
 41. Ward LD, Kellis M. HaploReg: a resource for exploring chromatin states, conservation, and regulatory motif alterations within sets of genetically linked variants. *Nucleic Acids Res*. 2012;40(Database issue):D930-4.
 42. Machiela MJ, Chanock SJ. LDlink: a web-based application for exploring population-specific haplotype structure and linking correlated alleles of possible functional variants. *Bioinformatics*. 2015;31(21):3555-7.
 43. Pritchard JK, Przeworski M. Linkage disequilibrium in humans: models and data. *Am J Hum Genet*. 2001;69(1):1-14.
-

44. Gabriel SB, Schaffner SF, Nguyen H, Moore JM, Roy J, Blumenstiel B, et al. The structure of haplotype blocks in the human genome. *Science*. 2002;296(5576):2225-9.
 45. Jorde LB. Linkage disequilibrium and the search for complex disease genes. *Genome Res*. 2000;10(10):1435-44.
 46. Boehnke M. A look at linkage disequilibrium. *Nat Genet*. 2000;25(3):246-7.
 47. Bush WS, Moore JH. Chapter 11: Genome-wide association studies. *PLoS Comput Biol*. 2012;8(12):e1002822.
 48. McCarthy MI, Abecasis GR, Cardon LR, Goldstein DB, Little J, Ioannidis JP, et al. Genome-wide association studies for complex traits: consensus, uncertainty and challenges. *Nat Rev Genet*. 2008;9(5):356-69.
 49. Ruiz-Linares A, Adhikari K, Acuna-Alonzo V, Quinto-Sanchez M, Jaramillo C, Arias W, et al. Admixture in Latin America: geographic structure, phenotypic diversity and self-perception of ancestry based on 7,342 individuals. *PLoS Genet*. 2014;10(9):e1004572.
 50. Yunis JJ, Garcia O, Uriarte I, Yunis EJ. Population data on 6 short tandem repeat loci in a sample of Caucasian-Mestizos from Colombia. *Int J Legal Med*. 2000;113(3):175-8.
 51. Sanchez-Diz P, Acosta MA, Fonseca D, Fernandez M, Gomez Y, Jay M, et al. Population data on 15 autosomal STRs in a sample from Colombia. *Forensic Sci Int Genet*. 2009;3(3):e81-2.
 52. Tabor HK, Risch NJ, Myers RM. Candidate-gene approaches for studying complex genetic traits: practical considerations. *Nat Rev Genet*. 2002;3(5):391-7.
 53. Burgner D, Jamieson SE, Blackwell JM. Genetic susceptibility to infectious diseases: big is beautiful, but will bigger be even better? *Lancet Infect Dis*. 2006;6(10):653-63.
 54. Ayo CM, Dalalio MM, Visentainer JE, Reis PG, Sippert EA, Jarduli LR, et al. Genetic susceptibility to Chagas disease: an overview about the infection and about the association between disease and the immune response genes. *Biomed Res Int*. 2013;2013:284729.
 55. Vasconcelos RH, Montenegro SM, Azevedo EA, Gomes YM, Morais CN. Genetic susceptibility to chronic Chagas disease: an overview of single nucleotide polymorphisms of cytokine genes. *Cytokine*. 2012;59(2):203-8.
 56. Deng X, Sabino EC, Cunha-Neto E, Ribeiro AL, Ianni B, Mady C, et al. Genome wide association study (GWAS) of Chagas cardiomyopathy in Trypanosoma cruzi seropositive subjects. *PLoS One*. 2013;8(11):e79629.
-

57. Band G, Le QS, Jostins L, Pirinen M, Kivinen K, Jallow M, et al. Imputation-based meta-analysis of severe malaria in three African populations. *PLoS Genet.* 2013;9(5):e1003509.
 58. White NJ, Pukrittayakamee S, Hien TT, Faiz MA, Mokuolu OA, Dondorp AM. Malaria. *Lancet.* 2014;383(9918):723-35.
 59. Trampuz A, Jereb M, Muzlovic I, Prabhu RM. Clinical review: Severe malaria. *Critical care.* 2003;7(4):315-23.
 60. Tournamille C, Colin Y, Cartron JP, Le Van Kim C. Disruption of a GATA motif in the Duffy gene promoter abolishes erythroid gene expression in Duffy-negative individuals. *Nat Genet.* 1995;10(2):224-8.
 61. King CL, Adams JH, Xianli J, Grimberg BT, McHenry AM, Greenberg LJ, et al. Fy(a)/Fy(b) antigen polymorphism in human erythrocyte Duffy antigen affects susceptibility to *Plasmodium vivax* malaria. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America.* 2011;108(50):20113-8.
 62. Gouagna LC, Bancone G, Yao F, Yameogo B, Dabire KR, Costantini C, et al. Genetic variation in human HBB is associated with *Plasmodium falciparum* transmission. *Nat Genet.* 2010;42(4):328-31.
 63. Weatherall DJ, Clegg JB. Genetic variability in response to infection: malaria and after. *Genes Immun.* 2002;3(6):331-7.
 64. Michael NL, Louie LG, Rohrbaugh AL, Schultz KA, Dayhoff DE, Wang CE, et al. The role of CCR5 and CCR2 polymorphisms in HIV-1 transmission and disease progression. *Nature medicine.* 1997;3(10):1160-2.
 65. Blackwell JM, Jamieson SE, Burgner D. HLA and infectious diseases. *Clin Microbiol Rev.* 2009;22(2):370-85, Table of Contents.
 66. Horton R, Wilming L, Rand V, Lovering RC, Bruford EA, Khodiyar VK, et al. Gene map of the extended human MHC. *Nat Rev Genet.* 2004;5(12):889-99.
 67. Williams-Blangero S, VandeBerg JL, Blangero J, Correa-Oliveira R. Genetic epidemiology of Chagas disease. *Adv Parasitol.* 2011;75:147-67.
 68. Cunha-Neto E, Chevillard C. Chagas disease cardiomyopathy: immunopathology and genetics. *Mediators Inflamm.* 2014;2014:683230.
 69. Ayo CM, Reis PG, Dalalio MM, Visentainer JE, Oliveira Cde F, de Araujo SM, et al. Killer Cell Immunoglobulin-like Receptors and Their HLA Ligands are Related with the Immunopathology of Chagas Disease. *PLoS Negl Trop Dis.* 2015;9(5):e0003753.
-

70. Florez O, Zafra G, Morillo C, Martin J, Gonzalez CI. Interleukin-1 gene cluster polymorphism in chagas disease in a Colombian case-control study. *Hum Immunol.* 2006;67(9):741-8.
 71. Zafra G, Morillo C, Martin J, Gonzalez A, Gonzalez CI. Polymorphism in the 3' UTR of the IL12B gene is associated with Chagas' disease cardiomyopathy. *Microbes Infect.* 2007;9(9):1049-52.
 72. Criado L, Florez O, Martin J, Gonzalez CI. Genetic polymorphisms in TNFA/TNFR2 genes and Chagas disease in a Colombian endemic population. *Cytokine.* 2012;57(3):398-401.
 73. Torres OA, Calzada JE, Beraun Y, Morillo CA, Gonzalez A, Gonzalez CI, et al. Role of the IFNG +874T/A polymorphism in Chagas disease in a Colombian population. *Infect Genet Evol.* 2010;10(5):682-5.
 74. Florez O, Martin J, Gonzalez CI. Interleukin 4, interleukin 4 receptor-alpha and interleukin 10 gene polymorphisms in Chagas disease. *Parasite Immunol.* 2011;33(9):506-11.
 75. Calzada JE, Beraun Y, Gonzalez CI, Martin J. Transforming growth factor beta 1 (TGFbeta1) gene polymorphisms and Chagas disease susceptibility in Peruvian and Colombian patients. *Cytokine.* 2009;45(3):149-53.
 76. Florez O, Martin J, Gonzalez CI. Genetic variants in the chemokines and chemokine receptors in Chagas disease. *Hum Immunol.* 2012;73(8):852-8.
 77. Machuca MA, Suarez EU, Echeverria LE, Martin J, Gonzalez CI. SNP/haplotype associations of CCR2 and CCR5 genes with severity of chagasic cardiomyopathy. *Hum Immunol.* 2014;75(12):1210-5.
 78. Torres OA, Calzada JE, Beraun Y, Morillo CA, Gonzalez CI, Gonzalez A, et al. Association of the macrophage migration inhibitory factor -173G/C polymorphism with Chagas disease. *Hum Immunol.* 2009;70(7):543-6.
 79. Robledo G, Gonzalez CI, Morillo C, Martin J, Gonzalez A. Association study of PTPN22 C1858T polymorphism in Trypanosoma cruzi infection. *Tissue Antigens.* 2007;69(3):261-4.
 80. Zafra G, Florez O, Morillo CA, Echeverria LE, Martin J, Gonzalez CI. Polymorphisms of toll-like receptor 2 and 4 genes in Chagas disease. *Mem Inst Oswaldo Cruz.* 2008;103(1):27-30.
 81. Deghaide NH, Dantas RO, Donadi EA. HLA class I and II profiles of patients presenting with Chagas' disease. *Dig Dis Sci.* 1998;43(2):246-52.
-

82. Drigo SA, Cunha-Neto E, Ianni B, Cardoso MR, Braga PE, Fae KC, et al. TNF gene polymorphisms are associated with reduced survival in severe Chagas' disease cardiomyopathy patients. *Microbes Infect.* 2006;8(3):598-603.
 83. Ramasawmy R, Cunha-Neto E, Fae KC, Muller NG, Cavalcanti VL, Drigo SA, et al. BAT1, a putative anti-inflammatory gene, is associated with chronic Chagas cardiomyopathy. *J Infect Dis.* 2006;193(10):1394-9.
 84. Ramasawmy R, Cunha-Neto E, Fae KC, Martello FG, Muller NG, Cavalcanti VL, et al. The monocyte chemoattractant protein-1 gene polymorphism is associated with cardiomyopathy in human chagas disease. *Clinical infectious diseases : an official publication of the Infectious Diseases Society of America.* 2006;43(3):305-11.
 85. Ramasawmy R, Fae KC, Cunha-Neto E, Muller NG, Cavalcanti VL, Ferreira RC, et al. Polymorphisms in the gene for lymphotoxin-alpha predispose to chronic Chagas cardiomyopathy. *J Infect Dis.* 2007;196(12):1836-43.
 86. Campelo V, Dantas RO, Simoes RT, Mendes-Junior CT, Sousa SM, Simoes AL, et al. TNF microsatellite alleles in Brazilian Chagasic patients. *Dig Dis Sci.* 2007;52(12):3334-9.
 87. Costa GC, da Costa Rocha MO, Moreira PR, Menezes CA, Silva MR, Gollob KJ, et al. Functional IL-10 gene polymorphism is associated with Chagas disease cardiomyopathy. *J Infect Dis.* 2009;199(3):451-4.
 88. Pissetti CW, Correia D, de Oliveira RF, Llaguno MM, Balarin MA, Silva-Grecco RL, et al. Genetic and functional role of TNF-alpha in the development *Trypanosoma cruzi* infection. *PLoS Negl Trop Dis.* 2011;5(3):e976.
 89. Dias FC, Medina Tda S, Mendes-Junior CT, Dantas RO, Pissetti CW, Rodrigues Junior V, et al. Polymorphic sites at the immunoregulatory CTLA-4 gene are associated with chronic chagas disease and its clinical manifestations. *PLoS One.* 2013;8(10):e78367.
 90. Nogueira LG, Frade AF, Ianni BM, Laugier L, Pissetti CW, Cabantous S, et al. Functional IL18 polymorphism and susceptibility to Chronic Chagas Disease. *Cytokine.* 2015;73(1):79-83.
 91. Nogueira LG, Santos RH, Ianni BM, Fiorelli AI, Mairena EC, Benvenuti LA, 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;6(10):e1867.
 92. Luz PR, Miyazaki MI, Chiminacio Neto N, Padeski MC, Barros AC, Boldt AB, et al. Genetically Determined MBL Deficiency Is Associated with Protection
-

- against Chronic Cardiomyopathy in Chagas Disease. *PLoS Negl Trop Dis.* 2016;10(1):e0004257.
93. Iwakura Y, Ishigame H, Saijo S, Nakae S. Functional specialization of interleukin-17 family members. *Immunity.* 2011;34(2):149-62.
94. Korn T, Bettelli E, Oukka M, Kuchroo VK. IL-17 and Th17 Cells. *Annu Rev Immunol.* 2009;27:485-517.
95. Iwakura Y, Nakae S, Saijo S, Ishigame H. The roles of IL-17A in inflammatory immune responses and host defense against pathogens. *Immunol Rev.* 2008;226:57-79.
96. Pitta MG, Romano A, Cabantous S, Henri S, Hammad A, Kouriba B, et al. IL-17 and IL-22 are associated with protection against human kala azar caused by *Leishmania donovani*. *J Clin Invest.* 2009;119(8):2379-87.
97. Nascimento MS, Carregaro V, Lima-Junior DS, Costa DL, Ryffel B, Duthie MS, et al. Interleukin 17A acts synergistically with interferon gamma to promote protection against *Leishmania infantum* infection. *J Infect Dis.* 2015;211(6):1015-26.
98. Ishida H, Imai T, Suzue K, Hirai M, Taniguchi T, Yoshimura A, et al. IL-23 protection against *Plasmodium berghei* infection in mice is partially dependent on IL-17 from macrophages. *Eur J Immunol.* 2013;43(10):2696-706.
99. da Matta Guedes PM, Gutierrez FR, Maia FL, Milanezi CM, Silva GK, Pavanelli WR, et al. IL-17 produced during *Trypanosoma cruzi* infection plays a central role in regulating parasite-induced myocarditis. *PLoS Negl Trop Dis.* 2010;4(2):e604.
100. Miyazaki Y, Hamano S, Wang S, Shimanoe Y, Iwakura Y, Yoshida H. IL-17 is necessary for host protection against acute-phase *Trypanosoma cruzi* infection. *J Immunol.* 2010;185(2):1150-7.
101. Magalhaes LM, Villani FN, Nunes Mdo C, Gollob KJ, Rocha MO, Dutra WO. High interleukin 17 expression is correlated with better cardiac function in human Chagas disease. *J Infect Dis.* 2013;207(4):661-5.
102. Dinarello CA. IL-18: A TH1-inducing, proinflammatory cytokine and new member of the IL-1 family. *J Allergy Clin Immunol.* 1999;103(1 Pt 1):11-24.
103. Nakanishi K, Yoshimoto T, Tsutsui H, Okamura H. Interleukin-18 is a unique cytokine that stimulates both Th1 and Th2 responses depending on its cytokine milieu. *Cytokine Growth Factor Rev.* 2001;12(1):53-72.
-

104. Sugawara I. Interleukin-18 (IL-18) and infectious diseases, with special emphasis on diseases induced by intracellular pathogens. *Microbes Infect.* 2000;2(10):1257-63.
 105. Akira S. The role of IL-18 in innate immunity. *Current opinion in immunology.* 2000;12(1):59-63.
 106. Haerberlein S, Sebald H, Bogdan C, Schleicher U. IL-18, but not IL-15, contributes to the IL-12-dependent induction of NK-cell effector functions by *Leishmania infantum* in vivo. *Eur J Immunol.* 2010;40(6):1708-17.
 107. Anyona SB, Kempaiah P, Raballah E, Ouma C, Were T, Davenport GC, et al. Functional promoter haplotypes of interleukin-18 condition susceptibility to severe malarial anemia and childhood mortality. *Infect Immun.* 2011;79(12):4923-32.
 108. Moravej A, Rasouli M, Asaei S, Kalani M, Mansoori Y. Association of interleukin-18 gene variants with susceptibility to visceral leishmaniasis in Iranian population. *Mol Biol Rep.* 2013;40(6):4009-14.
 109. Cheong JY, Cho SW, Oh B, Kimm K, Lee KM, Shin SJ, et al. Association of interleukin-18 gene polymorphisms with hepatitis B virus clearance. *Dig Dis Sci.* 2010;55(4):1113-9.
 110. Kim YS, Cheong JY, Cho SW, Lee KM, Hwang JC, Oh B, et al. A functional SNP of the Interleukin-18 gene is associated with the presence of hepatocellular carcinoma in hepatitis B virus-infected patients. *Dig Dis Sci.* 2009;54(12):2722-8.
 111. An P, Thio CL, Kirk GD, Donfield S, Goedert JJ, Winkler CA. Regulatory polymorphisms in the interleukin-18 promoter are associated with hepatitis C virus clearance. *J Infect Dis.* 2008;198(8):1159-65.
 112. Yue M, Wang JJ, Tang SD, Feng L, Zhang Y, Liu Y, et al. Association of interleukin-18 gene polymorphisms with the outcomes of hepatitis C virus infection in high-risk Chinese Han population. *Immunol Lett.* 2013;154(1-2):54-60.
 113. Dejean AS, Beisner DR, Ch'en IL, Kerdiles YM, Babour A, Arden KC, et al. Transcription factor Foxo3 controls the magnitude of T cell immune responses by modulating the function of dendritic cells. *Nat Immunol.* 2009;10(5):504-13.
 114. Lee JC, Espeli M, Anderson CA, Linterman MA, Pocock JM, Williams NJ, et al. Human SNP links differential outcomes in inflammatory and infectious disease to a FOXO3-regulated pathway. *Cell.* 2013;155(1):57-69.
-

115. Marlow G, Han DY, Triggs CM, Ferguson LR. Food Intolerance: Associations with the rs12212067 Polymorphism of FOXO3 in Crohn's Disease Patients in New Zealand. *J Nutrigenet Nutrigenomics*. 2015;8(2):70-80.
 116. Nguetse CN, Kreamsner PG, Velavan TP. FOXO3A regulatory polymorphism and susceptibility to severe malaria in Gabonese children. *Immunogenetics*. 2015;67(2):67-71.
 117. Lu Y, Zhu Y, Wang X, Wang F, Peng J, Hou H, et al. FOXO3 rs12212067: T > G Association with Active Tuberculosis in Han Chinese Population. *Inflammation*. 2016;39(1):10-5.
 118. Baeke F, Takiishi T, Korf H, Gysemans C, Mathieu C. Vitamin D: modulator of the immune system. *Curr Opin Pharmacol*. 2010;10(4):482-96.
 119. Van Belle TL, Gysemans C, Mathieu C. Vitamin D in autoimmune, infectious and allergic diseases: a vital player? *Best Pract Res Clin Endocrinol Metab*. 2011;25(4):617-32.
 120. Wang Y, Zhu J, DeLuca HF. Where is the vitamin D receptor? *Arch Biochem Biophys*. 2012;523(1):123-33.
 121. Haussler MR, Whitfield GK, Haussler CA, Hsieh JC, Thompson PD, Selznick SH, et al. The nuclear vitamin D receptor: biological and molecular regulatory properties revealed. *J Bone Miner Res*. 1998;13(3):325-49.
 122. Adams JS, Liu PT, Chun R, Modlin RL, Hewison M. Vitamin D in defense of the human immune response. *Ann N Y Acad Sci*. 2007;1117:94-105.
 123. Ihle JN. Cytokine receptor signalling. *Nature*. 1995;377(6550):591-4.
 124. Karaghiosoff M, Neubauer H, Lassnig C, Kovarik P, Schindler H, Pircher H, et al. Partial impairment of cytokine responses in Tyk2-deficient mice. *Immunity*. 2000;13(4):549-60.
 125. Shimoda K, Kato K, Aoki K, Matsuda T, Miyamoto A, Shibamori M, et al. Tyk2 plays a restricted role in IFN alpha signaling, although it is required for IL-12-mediated T cell function. *Immunity*. 2000;13(4):561-71.
 126. Shimoda K, Tsutsui H, Aoki K, Kato K, Matsuda T, Numata A, et al. Partial impairment of interleukin-12 (IL-12) and IL-18 signaling in Tyk2-deficient mice. *Blood*. 2002;99(6):2094-9.
 127. Minegishi Y, Saito M, Morio T, Watanabe K, Agematsu K, Tsuchiya S, et al. Human tyrosine kinase 2 deficiency reveals its requisite roles in multiple cytokine signals involved in innate and acquired immunity. *Immunity*. 2006;25(5):745-55.
-

128. Kreins AY, Ciancanelli MJ, Okada S, Kong XF, Ramirez-Alejo N, Kilic SS, et al. Human TYK2 deficiency: Mycobacterial and viral infections without hyper-IgE syndrome. *J Exp Med*. 2015;212(10):1641-62.
 129. Diogo D, Bastarache L, Liao KP, Graham RR, Fulton RS, Greenberg JD, et al. TYK2 protein-coding variants protect against rheumatoid arthritis and autoimmunity, with no evidence of major pleiotropic effects on non-autoimmune complex traits. *PLoS One*. 2015;10(4):e0122271.
 130. Lopez-Isac E, Campillo-Davo D, Bossini-Castillo L, Guerra SG, Assassi S, Simeon CP, et al. Influence of TYK2 in systemic sclerosis susceptibility: a new locus in the IL-12 pathway. *Ann Rheum Dis*. 2015.
 131. Adzhubei IA, Schmidt S, Peshkin L, Ramensky VE, Gerasimova A, Bork P, et al. A method and server for predicting damaging missense mutations. *Nat Methods*. 2010;7(4):248-9.
 132. Kumar P, Henikoff S, Ng PC. Predicting the effects of coding non-synonymous variants on protein function using the SIFT algorithm. *Nat Protoc*. 2009;4(7):1073-81.
 133. Miller SA, Dykes DD, Polesky HF. A simple salting out procedure for extracting DNA from human nucleated cells. *Nucleic Acids Res*. 1988;16(3):1215.
 134. Carlson CS, Eberle MA, Rieder MJ, Yi Q, Kruglyak L, Nickerson DA. Selecting a maximally informative set of single-nucleotide polymorphisms for association analyses using linkage disequilibrium. *Am J Hum Genet*. 2004;74(1):106-20.
 135. Barrett JC, Fry B, Maller J, Daly MJ. Haploview: analysis and visualization of LD and haplotype maps. *Bioinformatics*. 2005;21(2):263-5.
 136. Thompson SR, Humphries SE. Interleukin-18 genetics and inflammatory disease susceptibility. *Genes Immun*. 2007;8(2):91-9.
 137. Giedraitis V, He B, Huang WX, Hillert J. Cloning and mutation analysis of the human IL-18 promoter: a possible role of polymorphisms in expression regulation. *J Neuroimmunol*. 2001;112(1-2):146-52.
 138. Bouzgarrou N, Hassen E, Schvoerer E, Stoll-Keller F, Bahri O, Gabbouj S, et al. Association of interleukin-18 polymorphisms and plasma level with the outcome of chronic HCV infection. *J Med Virol*. 2008;80(4):607-14.
 139. Sakai K, Kita M, Sawai N, Shiomi S, Sumida Y, Kanemasa K, et al. Levels of interleukin-18 are markedly increased in *Helicobacter pylori*-infected gastric mucosa among patients with specific IL18 genotypes. *J Infect Dis*. 2008;197(12):1752-61.
-

140. Sanchez E, Palomino-Morales RJ, Ortego-Centeno N, Jimenez-Alonso J, Gonzalez-Gay MA, Lopez-Nevot MA, et al. Identification of a new putative functional IL18 gene variant through an association study in systemic lupus erythematosus. *Hum Mol Genet.* 2009;18(19):3739-48.
 141. Saijo T, Ito M, Takeda E, Huq AH, Naito E, Yokota I, et al. A unique mutation in the vitamin D receptor gene in three Japanese patients with vitamin D-dependent rickets type II: utility of single-strand conformation polymorphism analysis for heterozygous carrier detection. *Am J Hum Genet.* 1991;49(3):668-73.
 142. Arai H, Miyamoto K, Taketani Y, Yamamoto H, Iemori Y, Morita K, et al. A vitamin D receptor gene polymorphism in the translation initiation codon: effect on protein activity and relation to bone mineral density in Japanese women. *J Bone Miner Res.* 1997;12(6):915-21.
 143. Ma J, Stampfer MJ, Gann PH, Hough HL, Giovannucci E, Kelsey KT, et al. Vitamin D receptor polymorphisms, circulating vitamin D metabolites, and risk of prostate cancer in United States physicians. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev.* 1998;7(5):385-90.
 144. Morrison NA, Qi JC, Tokita A, Kelly PJ, Crofts L, Nguyen TV, et al. Prediction of bone density from vitamin D receptor alleles. *Nature.* 1994;367(6460):284-7.
 145. Livak KJ. Allelic discrimination using fluorogenic probes and the 5' nuclease assay. *Genetic analysis : biomolecular engineering.* 1999;14(5-6):143-9.
 146. Purcell S, Neale B, Todd-Brown K, Thomas L, Ferreira MA, Bender D, et al. PLINK: a tool set for whole-genome association and population-based linkage analyses. *Am J Hum Genet.* 2007;81(3):559-75.
 147. Skol AD, Scott LJ, Abecasis GR, Boehnke M. Joint analysis is more efficient than replication-based analysis for two-stage genome-wide association studies. *Nat Genet.* 2006;38(2):209-13.
 148. Leon Rodriguez DA, Echeverria LE, Gonzalez CI, Martin J. Investigation of the role of IL17A gene variants in Chagas disease. *Genes Immun.* 2015;16(8):536-40.
 149. Leon Rodriguez DA, Carmona FD, Echeverria LE, Gonzalez CI, Martin J. IL18 Gene Variants Influence the Susceptibility to Chagas Disease. *PLoS Negl Trop Dis.* 2016;10(3):e0004583.
 150. Leon Rodriguez DA, Gonzalez CI, Martin J. Analysis of association of FOXO3 gene with *Trypanosoma cruzi* infection and chronic Chagasic cardiomyopathy. *HLA.* 2016.
-

151. Leon Rodriguez DA, Carmona FD, Gonzalez CI, Martin J. Evaluation of VDR gene polymorphisms in *Trypanosoma cruzi* infection and chronic Chagasic cardiomyopathy. *Scientific reports*. 2016;6:31263.
 152. Kim SW, Kim ES, Moon CM, Park JJ, Kim TI, Kim WH, et al. Genetic polymorphisms of IL-23R and IL-17A and novel insights into their associations with inflammatory bowel disease. *Gut*. 2011;60(11):1527-36.
 153. Michailowsky V, Silva NM, Rocha CD, Vieira LQ, Lannes-Vieira J, Gazzinelli RT. Pivotal role of interleukin-12 and interferon-gamma axis in controlling tissue parasitism and inflammation in the heart and central nervous system during *Trypanosoma cruzi* infection. *The American journal of pathology*. 2001;159(5):1723-33.
 154. Yamaoka K, Saharinen P, Pesu M, Holt VE, 3rd, Silvennoinen O, O'Shea JJ. The Janus kinases (Jaks). *Genome Biol*. 2004;5(12):253.
 155. Szklarczyk D, Franceschini A, Wyder S, Forslund K, Heller D, Huerta-Cepas J, et al. STRING v10: protein-protein interaction networks, integrated over the tree of life. *Nucleic Acids Res*. 2015;43(Database issue):D447-52.
 156. von Mering C, Jensen LJ, Snel B, Hooper SD, Krupp M, Foglierini M, et al. STRING: known and predicted protein-protein associations, integrated and transferred across organisms. *Nucleic Acids Res*. 2005;33(Database issue):D433-7.
 157. Pravica V, Perrey C, Stevens A, Lee JH, Hutchinson IV. A single nucleotide polymorphism in the first intron of the human IFN-gamma gene: absolute correlation with a polymorphic CA microsatellite marker of high IFN-gamma production. *Hum Immunol*. 2000;61(9):863-6.
 158. Pravica V, Asderakis A, Perrey C, Hajeer A, Sinnott PJ, Hutchinson IV. In vitro production of IFN-gamma correlates with CA repeat polymorphism in the human IFN-gamma gene. *European journal of immunogenetics : official journal of the British Society for Histocompatibility and Immunogenetics*. 1999;26(1):1-3.
 159. Lopez-Maderuelo D, Arnalich F, Serantes R, Gonzalez A, Codoceo R, Madero R, et al. Interferon-gamma and interleukin-10 gene polymorphisms in pulmonary tuberculosis. *American journal of respiratory and critical care medicine*. 2003;167(7):970-5.
 160. Li MO, Wan YY, Sanjabi S, Robertson AK, Flavell RA. Transforming growth factor-beta regulation of immune responses. *Annu Rev Immunol*. 2006;24:99-146.
-

161. Araujo-Jorge TC, Waghabi MC, Hasslocher-Moreno AM, Xavier SS, Higuchi Mde L, Keramidias M, et al. Implication of transforming growth factor-beta1 in Chagas disease myocardopathy. *J Infect Dis.* 2002;186(12):1823-8.
 162. Xu S, Cao X. Interleukin-17 and its expanding biological functions. *Cellular & molecular immunology.* 2010;7(3):164-74.
 163. Reyes JL, Terrazas LI, Espinoza B, Cruz-Robles D, Soto V, Rivera-Montoya I, et al. Macrophage migration inhibitory factor contributes to host defense against acute *Trypanosoma cruzi* infection. *Infect Immun.* 2006;74(6):3170-9.
 164. Watford WT, Moriguchi M, Morinobu A, O'Shea JJ. The biology of IL-12: coordinating innate and adaptive immune responses. *Cytokine Growth Factor Rev.* 2003;14(5):361-8.
 165. Dinarello CA. Biologic basis for interleukin-1 in disease. *Blood.* 1996;87(6):2095-147.
 166. Qin S, Rottman JB, Myers P, Kassam N, Weinblatt M, Loetscher M, et al. The chemokine receptors CXCR3 and CCR5 mark subsets of T cells associated with certain inflammatory reactions. *J Clin Invest.* 1998;101(4):746-54.
 167. Rodriguez-Perez JM, Cruz-Robles D, Hernandez-Pacheco G, Perez-Hernandez N, Murguía LE, Granados J, et al. Tumor necrosis factor-alpha promoter polymorphism in Mexican patients with Chagas' disease. *Immunol Lett.* 2005;98(1):97-102.
 168. Marquet S, Conte I, Poudiougou B, Argiro L, Cabantous S, Dessein H, et al. The IL17F and IL17RA Genetic Variants Increase Risk of Cerebral Malaria in Two African Populations. *Infect Immun.* 2016;84(2):590-7.
 169. He X, Yan J, Zhu X, Wang Q, Pang W, Qi Z, et al. Vitamin D inhibits the occurrence of experimental cerebral malaria in mice by suppressing the host inflammatory response. *J Immunol.* 2014;193(3):1314-23.
 170. Cusick SE, Opoka RO, Lund TC, John CC, Polgreen LE. Vitamin D insufficiency is common in Ugandan children and is associated with severe malaria. *PLoS One.* 2014;9(12):e113185.
 171. Sortica VA, Cunha MG, Ohnishi MD, Souza JM, Ribeiro-dos-Santos AK, Santos SE, et al. Role of IL6, IL12B and VDR gene polymorphisms in *Plasmodium vivax* malaria severity, parasitemia and gametocytemia levels in an Amazonian Brazilian population. *Cytokine.* 2014;65(1):42-7.
 172. Ehrchen J, Helming L, Varga G, Pasche B, Loser K, Gunzer M, et al. Vitamin D receptor signaling contributes to susceptibility to infection with *Leishmania major*. *FASEB J.* 2007;21(12):3208-18.
-

173. Whitcomb JP, Deagostino M, Ballentine M, Fu J, Tenniswood M, Welsh J, et al. The Role of Vitamin D and Vitamin D Receptor in Immunity to *Leishmania* major Infection. *J Parasitol Res.* 2012;2012:134645.
 174. Schleicher U, Mattner J, Blos M, Schindler H, Rollinghoff M, Karaghiosoff M, et al. Control of *Leishmania* major in the absence of Tyk2 kinase. *Eur J Immunol.* 2004;34(2):519-29.
 175. Migita K, Sawakami-Kobayashi K, Maeda Y, Nakao K, Kondoh S, Sugiura M, et al. Interleukin-18 promoter polymorphisms and the disease progression of Hepatitis B virus-related liver disease. *Transl Res.* 2009;153(2):91-6.
 176. Chen C, Liu Q, Zhu L, Yang H, Lu W. Vitamin D receptor gene polymorphisms on the risk of tuberculosis, a meta-analysis of 29 case-control studies. *PLoS One.* 2013;8(12):e83843.
 177. Salimi S, Farajian-Mashhadi F, Alavi-Naini R, Talebian G, Narooie-Nejad M. Association between vitamin D receptor polymorphisms and haplotypes with pulmonary tuberculosis. *Biomed Rep.* 2015;3(2):189-94.
 178. Arji N, Busson M, Iraqi G, Bourkadi JE, Benjouad A, Bouayad A, et al. Genetic diversity of TLR2, TLR4, and VDR loci and pulmonary tuberculosis in Moroccan patients. *J Infect Dev Ctries.* 2014;8(4):430-40.
 179. Neela VS, Suryadevara NC, Shinde VG, Pydi SS, Jain S, Jonnalagada S, et al. Association of Taq I, Fok I and Apa I polymorphisms in Vitamin D Receptor (VDR) gene with leprosy. *Hum Immunol.* 2015;76(6):402-5.
 180. Martin JE, Assassi S, Diaz-Gallo LM, Broen JC, Simeon CP, Castellvi I, et al. A systemic sclerosis and systemic lupus erythematosus pan-meta-GWAS reveals new shared susceptibility loci. *Hum Mol Genet.* 2013;22(19):4021-9.
 181. Lopez-Isac E, Martin JE, Assassi S, Simeon CP, Carreira P, Ortego-Centeno N, et al. Cross-disease Meta-analysis of Genome-wide Association Studies for Systemic Sclerosis and Rheumatoid Arthritis Reveals IRF4 as a New Common Susceptibility Locus. *Arthritis & rheumatology.* 2016.
 182. Marquez A, Vidal-Bralo L, Rodriguez-Rodriguez L, Gonzalez-Gay MA, Balsa A, Gonzalez-Alvaro I, et al. A combined large-scale meta-analysis identifies COG6 as a novel shared risk locus for rheumatoid arthritis and systemic lupus erythematosus. *Ann Rheum Dis.* 2016.
 183. Festen EA, Goyette P, Green T, Boucher G, Beauchamp C, Trynka G, et al. A meta-analysis of genome-wide association scans identifies IL18RAP, PTPN2, TAGAP, and PUS10 as shared risk loci for Crohn's disease and celiac disease. *PLoS Genet.* 2011;7(1):e1001283.
-

184. Zhernakova A, Stahl EA, Trynka G, Raychaudhuri S, Festen EA, Franke L, et al. Meta-analysis of genome-wide association studies in celiac disease and rheumatoid arthritis identifies fourteen non-HLA shared loci. *PLoS Genet.* 2011;7(2):e1002004.
 185. Ellinghaus D, Ellinghaus E, Nair RP, Stuart PE, Esko T, Metspalu A, et al. Combined analysis of genome-wide association studies for Crohn disease and psoriasis identifies seven shared susceptibility loci. *Am J Hum Genet.* 2012;90(4):636-47.
 186. Wang Z, Gerstein M, Snyder M. RNA-Seq: a revolutionary tool for transcriptomics. *Nat Rev Genet.* 2009;10(1):57-63.
-

*“Mi sombra se ha hecho grande,
Tan grande,
Como mis ilusiones,
Mirando un futuro rebelde,
Con dudas y pocas definiciones”.*

Pablo Alejandro Víctor Herrera S. 1984-2010



中国信息学会

