T
521

90870

UNIVERSIDAD AUTONOMA METROPOLITANA
Unidad Iztapalapa.

Casa abierta al tiempo

DIVISIÓN DE CIENCIAS BIOLOGICAS Y DE LA SALUD.

PERFIL DE ANTÍGENOS HLA CLASE I Y II Y DE CITOCINAS EN LA ENFERMEDAD DE CHAGAS.

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL GRADO DE

DOCTOR EN CIENCIAS BIOLÓGICAS

P R E S E N T A

M. en Biol. Exp. David Cruz Robles

Director de Tesis: Dr. Gilberto Vargas Alarcón.
Directora de Tesis: Dra. Alda Rocío Ortiz Muñiz.
Asesor: Dr. Víctor M. Monteón Padilla.

MÉXICO, D.F. ENERO DEL 2005.

XOCHIMILCO SERVICIOS DE INFORMACION
ARCHIVO HISTORICO

El Doctorado en Ciencias Biológicas de la Universidad Autónoma Metropolitana está incluido en el Padrón de Postgrados de Excelencia del CONACyT y además cuenta con apoyo del mismo Consejo, con el convenio PFP-20-93.

Así mismo, el alumno contó con la beca número 91608 otorgada también por el CONACyT.

Este trabajo fue realizado en el Laboratorio de Biología Celular y Citometría de Flujo del Departamento de Ciencias de la Salud de la Universidad Autónoma Metropolitana, Unidad Iztapalapa y en el Laboratorio de Biología Molecular del Departamento de Fisiología del Instituto Nacional de Cardiología "Ignacio Chávez".

Casa abierta al tiempo
UNIVERSIDAD AUTÓNOMA METROPOLITANA-*Iztapalapa*

El jurado designado por las

Divisiones de Ciencias Biológicas y de la Salud de las

Unidades Iztapalapa y Xochimilco aprobaron la Tesis que

presentó:

M. en Biol. Exp. David Cruz Robles.

El día 18 de enero del año 2005

Comité Tutorial:

Tutor: Dr. Gilberto Vargas Alarcón. _____

Co-Tutor: Dra. Alda Rocío Ortiz Muñiz. _____

Asesor: Dr. Víctor Manuel Monteón Padilla. _____

Sinodal: Dr. Rubén Darío Martínez. _____

Sinodal: Dr. Rafael Bojalil Parra. _____

D E D I C A T O R I A :

El presente trabajo lo dedico principalmente a mis hijas Marisol y Anita, de quienes recibo constantes muestras de amor y de cariño, como una muestra de la constancia y el esfuerzo que deben tener en el camino de su educación y el enriquecimiento de su cultura.

A ti, Gabriela, como muestra de agradecimiento por todo el apoyo que me brindas, por los tiempos difíciles y los momentos compartidos.

A mis padres Rosario y Luis, por su apoyo, su ayuda y consejos, al igual que a mi abuelita Luisa por su ternura y todo su amor.

A mis hermanos: Luis Martín, Miguel Ángel y Rosario Elisa, como un estímulo más en el desarrollo de sus profesiones.

Y en general, a todas aquellas personas que han influido de alguna manera en mi formación profesional y humana.

A G R A D E C I M I E N T O S :

A mis tutores, la Dra. A. Rocío Ortiz Muñiz y el Dr. Gilberto Vargas Alarcón, por conducirme y orientarme en el campo de la inmunología y la inmunogenética y por su gran calidad humana.

Al Dr. Víctor M. Monteón Padilla, por permitirme, una vez más, interaccionar en el campo de la inmunoparasitología del *Trypanosoma cruzi* y por su sencillez humana.

A mis sinodales, el Dr. Rubén Darío Martínez y el Dr. Rafael Bojalil Parra, por sus atinados comentarios y sugerencias en la culminación de ésta tesis.

De manera especial, agradezco al Dr. Pedro A. Reyes López, por su confianza en mí y por permitirme seguir superándome en el ámbito de las ciencias médicas.

A Edith Cortés, Leo, Leti, Lupita, Higinio, Guadalupe, Nona, José Manuel, Ricardo y Pepillo, por esos grandes momentos que compartimos trabajando juntos en el laboratorio de Biología Celular y Citometría de Flujo de la UAM-Iztapalapa y en el Laboratorio de Biología Molecular del Departamento de Fisiología del INCICH, respectivamente.

A todos mis compañeros y amigos del Departamento de Patología del INCICH: Olga, Adgine, Lupito, Efrén, Miguel, María Elena, Rodrigo, Israel, Judith, Anita, Benito, Mario, Sergio, Dra. Loredo, Dra. Soto, Dra. Ávila y Dr. Aranda, por su compañerismo y su amistad.

I N D I C E

Dedicatoria v

Agradecimientos vi

Abreviaturas x

Lista de Tablas xi

Lista de Figuras xii

Resumen xiii

Abstract xvi

I. INTRODUCCIÓN 1

I.1 Ciclo de vida de *Trypanosoma cruzi* 1

I.2 Ciclo de Transmisión de *T. cruzi* 2

I.3 Características Clínicas de la enfermedad de Chagas 3

I.4 Distribución geográfica de la enfermedad de Chagas 4

I.5 Enfermedad de Chagas en México 6

I.5.1 Reservorios de *T. cruzi* en México 7

I.5.2 Transmisores de *T. cruzi* en México 7

I.6 Variabilidad biológica de *T. cruzi* 9

II. ANTECEDENTES 11

II.1 Patogenia de la enfermedad de Chagas 11

II.1.1 Hipótesis Toxigénica e Hipersensibilidad retardada 11

II.1.2 Hipótesis Autoinmune 13

II.1.3 Miocarditis Autoinmune 15

II.2 Citocinas en la enfermedad de Chagas 17

II.3 Sistema Principal de Histocompatibilidad 22

II.3.1 Genes Clase I 25

II.3.2 Genes Clase II 27

II.3.3 Genes Clase III 30

II.3.4 Papel Fisiológico del Complejo 31

II.3.5 Procesamiento y Presentación de Antígenos 32

II.4 Marcadores HLA en la enfermedad de Chagas 34

III. JUSTIFICACIÓN 36

IV. OBJETIVOS 37

IV.1 Objetivo General 37

IV.2 Objetivos Particulares 37

V. MATERIAL Y MÉTODOS 38

V.1 Diseño del Estudio 38

V.2 Estrategia General 38

V.3 Estudio Clínico 41

V.3.1 Criterios de Inclusión 41

V.3.2 Criterios de Eliminación 42

V.3.3 Criterios de Exclusión 42

V.4 Citometría de Flujo 42

V.4.1 Colecta y preparación de la muestra 42

V.4.2 Tinción de superficie 43

V.4.3 Tinción intracelular 43

V.4.4 Adquisición y análisis 44

V.5 Estudio Molecular 45

V.5.1 Extracción y Purificación de DNA 45

V.5.2 Tipificación de los genes HLA clase I y II 46

V.5.2.1 Amplificación por PCR 46

V.5.2.2 Tipificación por Dot-blot inverso 47

V.5.3 Análisis por RFLP's del promotor de TNF-α 49

V.5.3.1 Amplificación por PCR 49

V.5.3.2 Análisis con Endonucleasas de Restricción 50

V.6 Análisis de Resultados 51

VI. RESULTADOS 52

VI.1 Estudio Clínico 52

VI.2 Perfil de Citocinas 53

VI.3 Perfil de Antígenos HLA clase I y II 57

VI.4 Polimorfismo del promotor del TNF-α 62

VII. DISCUSIÓN 68

VIII. CONCLUSIONES 77

IX. BIBLIOGRAFÍA 79

X. ANEXOS 103

Abreviaturas

ADN	Ácido desoxiribonucléico.
APC	Célula presentadora de antígenos.
BAT	Transcritos asociados a moléculas HLA-B.
CCC	Cardiomiopatía Chagásica Crónica.
ECG	Electrocardiograma.
HLA	Antígenos leucocitarios humanos.
HR	Hipersensibilidad retardada.
IC	Intervalo de confianza.
IFI	Inmunofluorescencia indirecta.
IFN-γ	Interferón gama.
IL-2	Interleucina 2.
IL-4	Interleucina 4.
Kb	Kilobases.
Kd	Kilodaltones.
LMP	Proteínas del proteosoma.
LT	Linfocito T.
MABs	Anticuerpos monoclonales.
NK	Células asesinas naturales.
pb	Pares de bases.
pC	Valor corregid de *p*.
PCR	Reacción en cadena de la polimerasa.
PCR-SSO	PCR con oligonucleótidos secuencia específica.
RE	Retículo endoplásmico.
RM	Razón de Momios.
SPH	Sistema principal de histocompatibilidad.
TAP	Transportador de péptidos inmunogénicos.
T_C	Célula T citotóxica (CD8+).
T_H	Célula T cooperadora (CD4+).
TGF-β	Factor de crecimiento tumoral beta.
TNF-α	Factor de necrosis tumoral alfa.

Lista de Tablas

Tabla 1. Enfermedades asociadas a distintos tipos de antígenos HLA. 23

Tabla 2. Porcentaje de células CD4+ en individuos infectados y sanos. 55

Tabla 3. Porcentaje de células CD8+ en individuos infectados y sanos. 56

Tabla 4. Porcentaje de células CD4+ en individuos con CCC, asintomáticos e individuos sanos. 57

Tabla 5. Porcentaje de células CD8+ en individuos con CCC, asintomáticos e individuos sanos. 58

Tabla 6. Frecuencias génicas de los alelos HLA-A, B y DR en individuos Infectados y sanos. 61

Tabla 7. Frecuencias génicas de HLA-A en individuos con CCC, asintomáticos y sanos. 62

Tabla 8. Frecuencias génicas de HLA-B en individuos con CCC, asintomáticos y sanos. 63

Tabla 9. Frecuencias génicas de HLA-DR en individuos con CCC, asintomáticos y sanos. 65

Tabla 10. Frecuencias alélicas y genotípicas del polimorfismo de los promotres -238 y -308 del gen TNF-α en individuos infectados y sanos. 66

Tabla 11. Frecuencias alélicas y genotípicas del polimorfismo de los promotres -238 y -308 del gen TNF-α en individuos con CCC, asintomáticos y sanos. 67

Lista de Figuras

Figura 1. Ciclo de vida de *Trypanosoma cruzi.* 1

Figura 2. Ciclos de transmisión de *T. cruzi.* 2

Figura 3. Tripomastigote sanguíneo. 3

Figura 4. Distribución de la enfermedad de Chagas en América. 5

Figura 5. Tripanosomosis americana en la República Mexicana. 6

Figura 6. Transmisores de *T. cruzi* en la República Mexicana. 8

Figura 7. Mapa génico del SPH humano. 25

Figura 8. Molécula HLA clase I. 27

Figura 9. Molécula HLA clase II. 30

Figura 10. Vías de procesamiento y presentación de antígenos. 34

Figura 11. Expresión de citocinas en células CD4+. 54

Figura 12. PCR de los exones 2 y 3 del gen HLA-A. 59

Figura 13. PCR del exón 2 del gen HLA-DR. 59

Figura 14. Dot-blot reverse para HLA-DR. 60

Figura 15. RFLP's para el promotor -308 del gen TNF-α 64

RESUMEN

La enfermedad de Chagas contribuye significativamente a la morbi-mortalidad cardiovascular en diversos países de Latinoamérica. Las manifestaciones clínicas en ésta enfermedad incluyen una fase aguda y una crónica. La primera se caracteriza por niveles muy altos de parasitemia, gran cantidad de parasitismo tisular y clínicamente por fiebres, malestar general, adenomegalia, hepatomegalia y esplenomegalia. La fase crónica sigue a la infección inicial con lesiones irreversibles después de 10 a 20 años. Las formas clínicas mas comunes de esta fase incluyen una forma cardiaca, una digestiva, mixta e indeterminada (latente). Se calcula que la forma cardiaca se presenta en un 27% de personas con infección crónica. Las formas latentes o intermedias se presentan en la mayoría de los pacientes (61% aproximadamente) y se caracterizan por no presentarse sintomatología, ECG sin cambios ni anormalidades digestivas; pero la serología es positiva. En la fase crónica la patogénesis es difícil de explicar, pues el daño celular se asocia a infiltrado linfocitario sin presencia del parásito, por lo cual se generan varias hipótesis que tratan de explicar este fenómeno. Algunas de ellas son: a) daño directo por el parásito al replicarse dentro de las células parasitadas; b) destrucción de fibras nerviosas en los órganos afectados, c) daño mediado por hipersensibilidad tipo IV y d) destrucción de células cardiacas y del sistema de conducción por autoinmunidad. Así pues, la inmunidad y la patología suelen estar controladas por las citocinas, las cuales pueden ayudarnos a disecar y analizar la respuesta inmune. En el presente trabajo se utilizó la citometría de flujo para estudiar los niveles intracelulares de IL-2, IL-4 e interferón gama (IFN-γ), así como de los receptores CD25 (receptor de IL-2) y CD132 (receptor de IL-4) y el marcador de activación temprana CD69 en células T CD4+ y CD8+, de sujetos sanos y pacientes chagásicos crónicos e indeterminados. El análisis estadístico mostró

que existen un gran número de células T activadas (CD69+) en individuos infectados (asintomáticos o con CCC) en comparación con los controles, tanto en células CD4+ como en CD8+. Por otro lado, se observó una disminución de la expresión de IL2, IFN-γ e IL-4 en los individuos asintomáticos y crónicos comparados con los controles sanos, lo cual puede deberse a la gran cantidad de células reguladoras $CD4^{+}CD25^{+}$ que se observaron en éstos individuos. Así mismo, se observó que no existen diferencias entre el número de células que expresan éstas citocinas en individuos asintomáticos y con CCC, por lo cual no podemos observar una polarización de la respuesta inmune en los individuos estudiados. Por otro lado, diversos estudios sugieren la participación de las moléculas del sistema principal de histocompatibilidad (SPH) en la regulación de la respuesta inmune ante la infección por *Trypanosoma cruzi* y la asociación de sus antígenos con el daño cardiaco. Aquí se analizaron los alelos clase I (HLA-A y HLA-B) y clase II (HLA-DR) del SPH por el método de reacción en cadena de la polimerasa y oligonucleótidos de secuencia específica (PCR-SSO), en 66 individuos seropositivos a *T. cruzi*, con y sin cardiomiopatía y 127 individuos sanos. El grupo total de individuos seropositivos a *T. cruzi* reveló un incremento de las frecuencias de HLA-B39 (pC= 4.3×10^{-5}, RM= 3.35) y del HLA-DR4 (pC= 1.8×10^{-5}, RM= 2.91) cuando se compararon contra los controles sanos. Así mismo, se observaron frecuencias génicas incrementadas en el HLA-A68 y HLA-B39 en los individuos asintomáticos comparados con los crónicos (pC= 0.014, RM= 4.99 y pC= 0.001, RM= 4.46 respectivamente). El HLA-B35 se incrementó en los pacientes crónicos comparados con los controles (pC= 0.048, RM= 2.56). Para clase II, se encontraron incrementadas las frecuencias génicas del HLA-DR16 para los crónicos comparados contra los asintomáticos (pC= 0.05, RM= No determinada) y contra los controles (pC= 0.02, OR= 5.0). Lo anterior sugiere que el HLA-DR4 y HLA-B39 están

asociados directamente con la infección por *T. cruzi*, mientras que el HLA-B35 y el HLA-DR16 podrían conferir susceptibilidad al desarrollo de la fase crónica de la enfermedad. El HLA-A68 puede ser un alelo de protección en el desarrollo de la cardiomiopatía. Finalmente, algunos estudios en pacientes chagásicos han reportado un incremento considerable de los niveles séricos de TNF-α e incluso una sobre expresión de ésta citosina en linfocitos de dichos pacientes. En este sentido, estudiamos las frecuencias alélicas y genotípicas del polimorfismo del promotor de TNF-α (posiciones -238 y -308) en el grupo total de pacientes infectados con *T. cruzi* y controles sanos. El grupo de pacientes infectados mostró incremento de la frecuencia del alelo -308 T2 (A) al compararlo con el grupo control (pC= 0.008, RM= 3.03, IC 95%= 1.29-7.12). Al analizar las frecuencias génicas y alélicas en los grupos por separado, el análisis estadístico mostró incremento de la frecuencia alélica -308 T2 (A) y genotípica -308 T1T2 (AG) en el grupo de pacientes con CCC cuando se compararon con los asintomáticos (pC= 0.0002, RM= No definida y pC= 0.003, RM= No definida, respectivamente); y también al compararlos contra los controles (pC= $4x10^{-7}$, RM= 7.02, IC95%= 2.87-17.22 y pC= 0.0006, RM= 5.29, IC95%= 1.8-15.46). Todos los pacientes positivos para el alelo T2 (A), presentaron cardiopatía chagásica crónica. Así mismo, los pacientes con CCC mostraron incremento de la frecuencia genotípica -308 T2T2 (AA) al ser comparada con el grupo control (pC= 0.012, RM= No definida) En conclusión, la enfermedad de Chagas está asociada con el polimorfismo de TNF-α en la población Mexicana, y el alelo TNF-308 T2 puede ser un marcador involucrado en el desarrollo de la fase crónica de la enfermedad y podría usarse como un marcador pronóstico en la progresión del daño cardiaco en pacientes con enfermedad de Chagas.

ABSTRACT

Chagas' disease contributes significantly to cardiovascular morbidity and mortality in several Latin-American countries. Chronic human Chagas' disease ranges from an asymptomatic to a severe cardiac clinical form. The involvement of the host's immune response in the development and maintenance of chagasic pathology has been demonstrated by several groups. Chronic cardiac Chagas' disease represents the result of a close interaction between the host and the parasite, causing different clinical pictures. We studied the production of cytokines (IL-2, IFN-γ and IL-4) and their receptors (CD25 and CD132) in CD4+ and CD8+ T cells of asymptomatic and chronic chagasic patients. We studied an activation antibody (CD69) too. Our findings shown an increased of CD69+ cells in infected patients (asymptomatics or with cardiomyopathy) when compared to healthy individuals. We detected $CD4^{+}CD25^{+}$ T cells increased in infected individuals and expression diminished of IL-2, IFN-γ and IL-4 cytokines in the same individuals when compared with healthy controls. By other hand, previous studies have shown the effect of the HLA molecules in the immune response regulation of *Trypanosoma cruzi* infection, and the association of HLA antigens with heart damage. We study the MHC class I (HLA-A and HLA-B), and class II (HLA-DR) genes in a sample of sixty-six serologically positive individuals with and without cardiomyopathy, and in one hundred twenty-seven healthy controls. The total group of seropositive individuals showed increased frequencies of HLA-B39 (pC= 4.32×10^{-5}, OR=3.35) and DR4 (pC= 1.8×10^{-5}, OR=2.91) when compared to healthy controls. Increased frequencies of HLA-A68 and HLA-B39 were found in asymptomatic individuals when compared to patients with cardiomyopathy (pC= 0.014, OR= 4.99 and pC= 0.001, OR= 4.46, respectively). Also, patients with cardiomyopathy showed increased frequency of HLA-B35 when compared to

healthy controls (pC= 0.048, OR= 2.56). The HLA-DR16 frequency was increased in patients with cardiomyopathy compared to asymptomatic individuals (pC= 0.05; OR= No determined) and healthy controls (pC= 0.02; OR= 5.0). The results suggest that MHC alleles might be associated with the development of chronic infection and with heart damage in Chagas' disease. HLA-DR4 and HLA-B39 could be associated directly with the infection by *T. cruzi*, whereas, HLA-DR16 could be marker of susceptibility to heart damage and HLA-A68 might confer protection to develop cardiomyopathy.

By other hand, the reason why one thirty of individuals infected with *Trypanosoma cruzi* goes on to develop Chronic Chagas' disease is not clearly understood. Experimental studies have suggested that high TNF alpha levels in plasma or produced in the target organ of the disease is responsible, at least in part, for the severe pathology associated whit the later stages of infection. The aim of this study was to investigate whether the promoter polymorphisms at the TNF alpha are associated with Chagas' disease. We determinate the TNF (positions -308, and -238) genotypes in a sample of 54 serologically positive chagasic individuals and in 162 healthy controls from a Mexican population where *Trypanosoma cruzi* infection is endemic. The patients were divided according clinical characteristics as asymptomatics (n= 27), and chronic chagasic cardiopathy patients (n= 27), in order to search for genetic differences associated with this pathological condition. The whole group of patients showed an increased frequencies of -308 T2 (A) allele when compared to healthy controls (pC= 0.008, OR= 3.03, 95%CI= 1.29-7.12). Statistical analysis showed an increased frequencies of T2 (A) allele and T1T2 (AG) genotype only in the group of patients with CCC when compared to asymptomatic individuals (pC= 0.0002, OR= Undefined, and pC = 0.003, OR = Undefined, respectively) and healthy controls (pC= 4 X 10^{-7}, OR= 7.02, and pC = 0 0006, OR = 5.29, respectly). Also a decreased frequencies of T1 (G) allele were found in CCC

patients when compared to asymptomatic individuals (pC= 0.0002, OR = Undefined). The T1T1 (GG) genotype frequencies was found decreased in CCC patients compared to asymptomatic patients (pC = 0.0006, OR = Undefined). The present study demonstrates that Chagas' disease is associated with TNF alpha polymorphisms in the Mexican population, and the TNF -308 could be directly involved in the genetic susceptibility to the disease.

I. INTRODUCCIÓN:

La enfermedad de Chagas o Tripanosomiasis Americana, es una enfermedad resultado de la infección por un protozoario flagelado: el *Trypanosoma cruzi*. Esta enfermedad fue descrita en 1909, cuando en Minas Gerais, Brasil, Carlos Chagas descubrió en la sangre de una niña de la localidad un parásito flagelado y observó que la enfermedad progresa en tres fases consecutivas: una fase aguda, una indeterminada o asintomática y una crónica (Chagas C, 1909).

I.1. Ciclo de Vida de Trypanosoma cruzi:

La forma infectante de *T. cruzi* es el tripomastigote metacíclico, el cual es excretado del intestino posterior del vector (Chinche besucona) al momento en que este se alimenta del hospedero y los parásitos salen junto con las heces fecales u orina de la chinche. Penetran al torrente sanguíneo del huésped por escarificaciones de la piel o infección de las mucosas o conjuntivas (Romaña C, 1935). Posteriormente, ocurre una penetración de células locales en donde pasan a un estadío intracelular obligado llamado amastigote. En esta fase, los parásitos se multiplican por fisión binaria y después de cinco días aproximadamente, rompen las células tisulares dando origen a una nueva fase del ciclo, el tripomastigote flagelado o sanguíneo. Esta forma del parásito es muy activa y visible

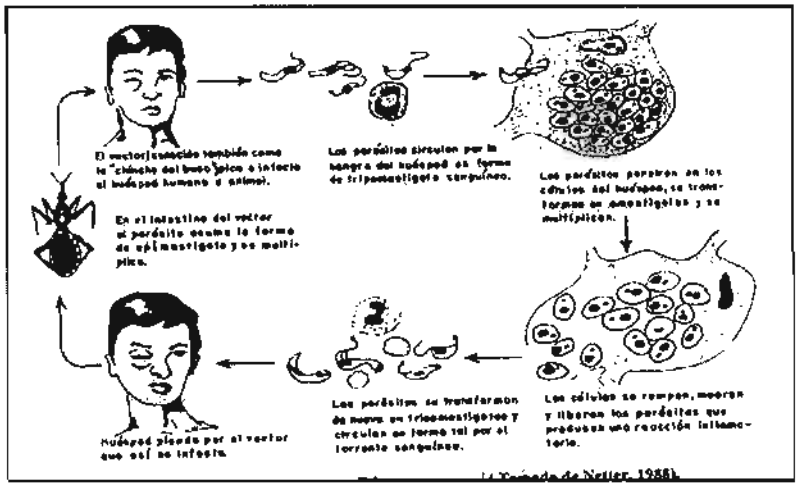


Fig. 1.- Ciclo de vida de *Trypanosoma cruzi*.

en el torrente sanguíneo; además parasita diversos órganos entre los cuales destacan el corazón, esófago, intestino grueso, músculo esquelético y sistema nervioso periférico (Fig.1) (Horare CA, 1966).

I.2 Ciclo de transmisión de T. cruzi:

Los parásitos se transmiten al humano por diferentes insectos triatominos hematófagos con más de 100 especies en el Continente Americano; 36 de los cuales se relacionan directamente con el humano (Hovba V, 1980).

Existen varios ciclos vector-hospedero en la transmisión del parásito: doméstico, peridoméstico y selvático o silvestre (Fig. 2). El ciclo silvestre o selvático, ocurre exclusivamente entre mamíferos silvestres y el vector transmisor (triatominos de la familia *Triatomineae*). El ciclo peridoméstico ocurre entre mamíferos domésticos o silvestres que habitan cerca de los hábitat humanos, y se relacionan o entran en contacto con el vector hospedero, de tal suerte que estas chinches transmiten la infección adquirida de mamíferos silvestres a animales domésticos como perros, gatos, etc. o, viceversa, adquirirla de animales domésticos y retroalimentar al ciclo silvestre. El ciclo doméstico involucra al hombre y animales domésticos con el transmisor; pero este ciclo también interactúa con los otros dos ya mencionados. La infección también se transmite por infección congénita o transfusión sanguínea y un incremento importante se da por la migración masiva del área rural a la urbana en zonas

Fig. 2.- Ciclos de transmisión de *Trypanosoma cruzi*.

endémicas de esta enfermedad (Elkeles G, 1951). En este sentido, Goldsmith y colaboradores, en 1973, informaron de algunos hallazgos encontrados en el estado de Oaxaca en estudios serológicos realizados en donadores de sangre, en los cuales reportaron seropositividad hacia antígeno de *T. cruzi* (Goldsmith RS et al. 1973). Monteón y colaboradores, en 1985, realizaron un trabajo en bancos de sangre de varios hospitales de la Ciudad de México y zona conurbana, analizando la serología de los donadores. En este trabajo se reportó el 1% de seropositividad en los donantes de sangre debido a que existe una marcada afluencia de donadores rurales hacia estos hospitales (Monteon VM et al. 1987).

I.3 Características clínicas de la enfermedad de Chagas:

La enfermedad es originalmente una zoonosis asociada a mamíferos selváticos. Para darse en el humano, éste debe habitar, en primera instancia, en condiciones apropiadas para el desarrollo del vector: en zonas endémicas, cerca de regiones cálidas y en pueblos marginados y de escasos recursos con presencia del vector.

Una vez que se da la parasitosis en el humano, esta cursa por una fase aguda, una indeterminada y una crónica. La primera se caracteriza por niveles muy altos de parasitemia, gran cantidad de parasitismo tisular y clínicamente por fiebres, malestar general, adenomegalia, hepatomegalia y esplenomegalia;

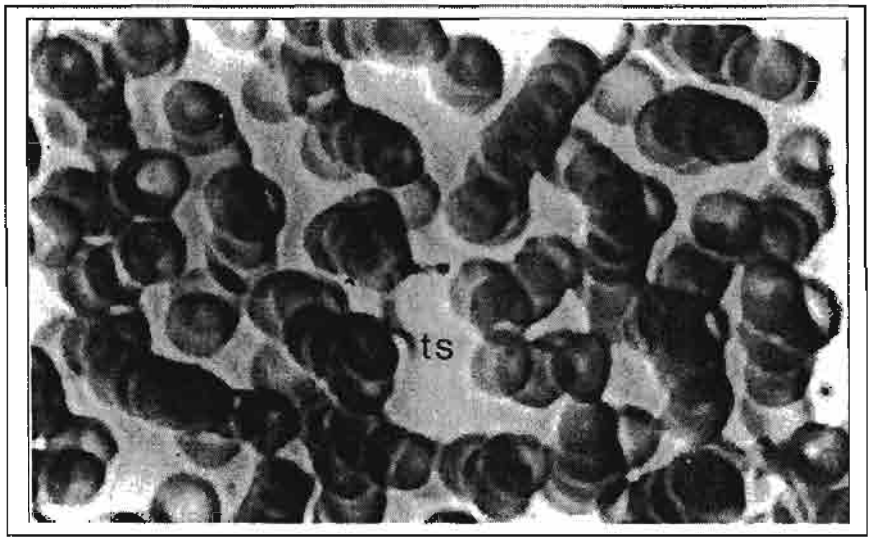


Fig. 3 Tripomastigote sanguíneo (ts). Frotis en fresco (Giemsa 1000X).

además, otras manifestaciones de esta fase incluyen el edema facial, miocarditis y meníngoencefalitis, que es fatal especialmente en niños. La parasitemia se demuestra por observación directa de parásitos en laminillas de sangre en fresco o por xenodiagnóstico (Fig. 3). La fase aguda se mantiene por 4 a 8 semanas y aproximadamente el 10% de los casos son detectables por su sintomatología los cuales son, generalmente, niños (Pereira JB et al. 1985).

Las formas latentes o intermedias representan el 61% de los casos infectados, quienes no presentan sintomatología, electrocardiograma (ECG) normal, sin afecciones digestivas; pero con serología positiva. La mayoría de individuos infectados quizá permanezcan en esta fase por el resto de su vida. La fase crónica sigue a la infección inicial con lesiones irreversibles después de 10 a 20 años. Las formas clínicas mas comunes de esta fase incluyen una forma cardiaca, una digestiva y una mixta. Es común encontrar formas cardiacas que se encuentran en grupos de edad adulta (entre 20 y 40 años de edad), que se caracterizan por presentar ECG con bloqueo completo de la rama derecha, hemibloqueo anterior izquierdo y bloqueo atrio ventricular asociado con crecimiento de ondas T y extrasístoles ventriculares; fallas cardiacas y muerte súbita. Se calcula que esta forma se presenta en un 27% de individuos infectados. Las formas digestivas se caracterizan por su movilidad dañina, megaesófago y megacolon y aparecen en el 3% aproximadamente de las personas infectadas. Las formas mixtas incluyen una mezcla de formas cardiacas y digestivas (8%), y también pueden presentarse formas nerviosas (1%) con lesiones neuromotoras a nivel del sistema nervioso periférico (Pereira JB et al. 1985).

I.4 Distribución geográfica de la enfermedad de Chagas:

Por otro lado, la enfermedad de Chagas se limita al Continente Americano y particularmente a los países tropicales y subtropicales de Latinoamérica (Fig. 4). En casi todos

los países de América se estudian casos de la enfermedad de Chagas y constituye ésta un grave problema de salud pública. Datos de la Organización Mundial de la Salud indican que aproximadamente 90 millones de personas en los países de Latinoamérica están expuestos a ésta infección (PHO, 1984; WHO, 1991) y del 30 al 40% de ellos desarrollan la fase crónica con manifestaciones clínicas (TDR, 1982). La distribución, frecuencia y patología de la enfermedad varía de país en país y aún dentro de cada uno. La gente joven es la más afectada por infección aguda y la adulta padece la forma crónica de ésta. También influyen las variaciones geográficas en la frecuencia y en las manifestaciones clínicas.

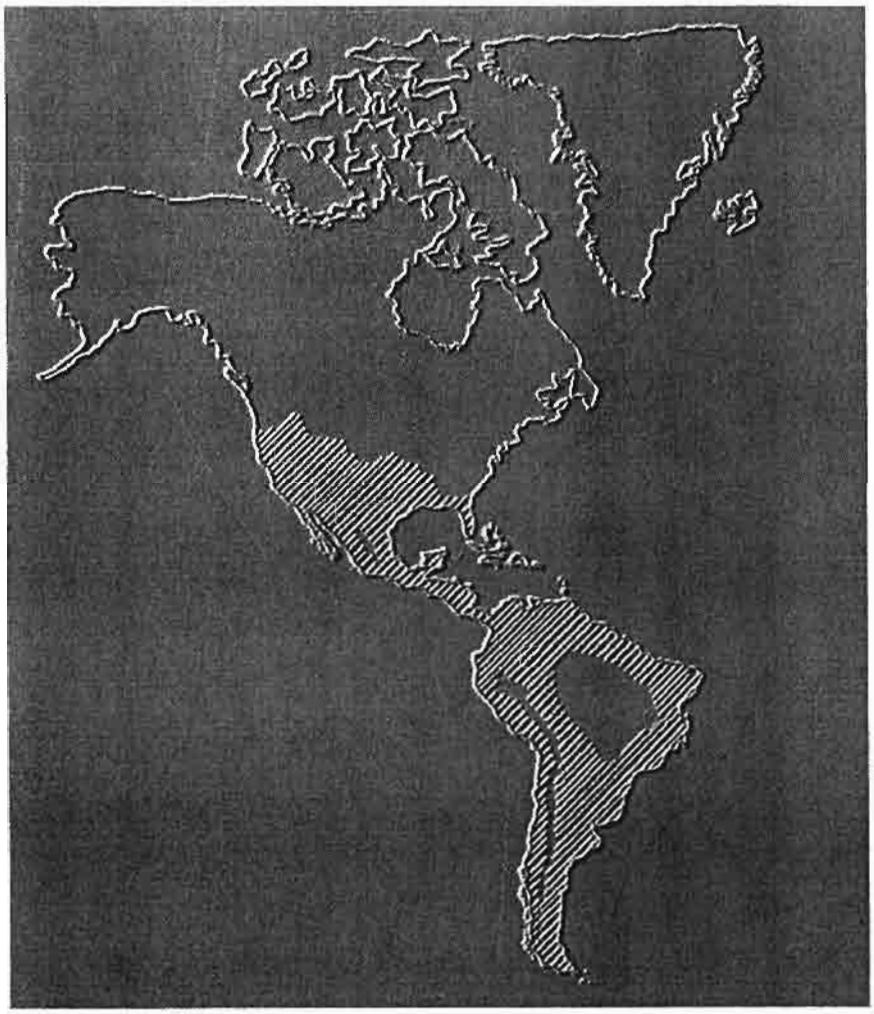


Fig.4 Distribución de la enfermedad de Chagas (líneas diagonales) en el Continente Americano (7).

Se estima que en Bolivia la incidencia de la infección se da en 20 mil casos por año debido a transfusiones sanguíneas (Schumins GA, 1985). En las áreas endémicas de Brasil muere el 10% de pacientes de entre 25 y 65 años de edad por enfermedad crónica de Chagas (Gomez PM, 1984).

I.5 Enfermedad de Chagas en México:

En México, el estudio de esta enfermedad se remonta a los trabajos efectuados por Mazzotti en 1936 (Mazzotti, 1936); sin embargo, los dos primeros casos humanos comprobados parasitológicamente se reportaron en 1940, en el municipio de Teojomulco, Oaxaca (Mazzotti, 1940). En 1964, Biagi y colaboradores hicieron un estudio en diversos municipios de los estados de Yucatán, México, Sonora, Guerrero, Oaxaca y Nayarit, y reportaron cuatro casos mas, además de otros cuatro mencionados por comunicación personal a Tay de Pérez Reyes en el mismo año (Biagi F et al. 1964, Tay J et al. 1980). De 1936 a 1979, se registraron un total de 148 casos de tripanosomosis americana en diversas localidades de la República Mexicana y de 1977 a 1988 se estableció el diagnóstico de tripanosomiasis americana en 39 sujetos estudiados en el Instituto Nacional de Cardiología, "Ignacio Chávez" (Gloss G et al. 1990). Los datos más recientes de casos estudiados en nuestro país son los observados en el estudio reportado por Sosa-Jurado y colaboradores, quienes estudiaron a 617 sujetos voluntarios, provenientes de los estados de Puebla y Chiapas (considerados como regiones de baja y alta endemia, respectivamente) y en donde encontraron una seroprevalencia de anticuerpos *anti-T.*

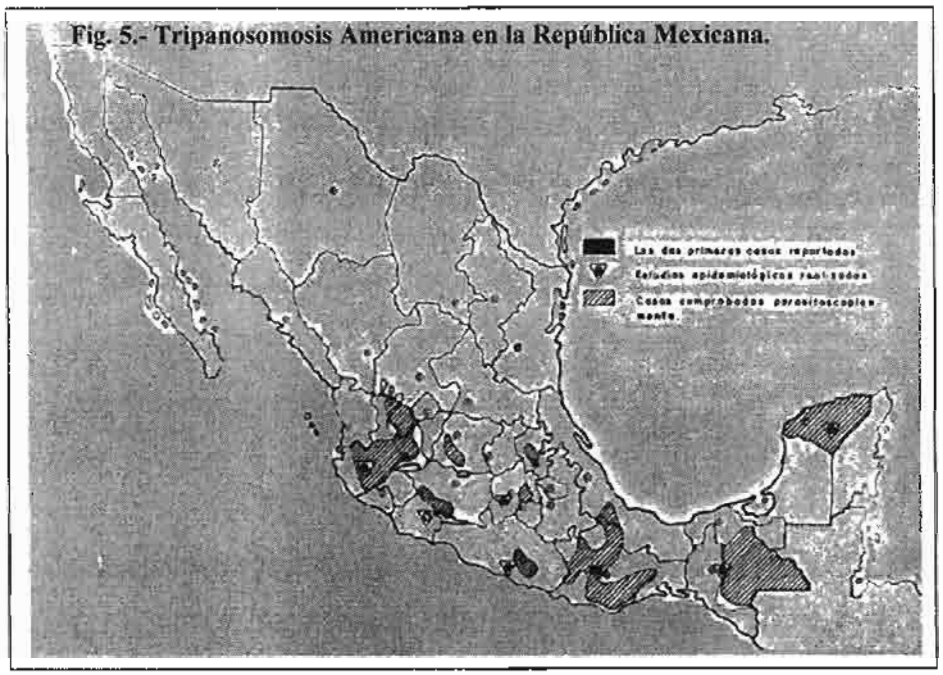


Fig. 5.- Tripanosomosis Americana en la República Mexicana.

cruzi de 4% y 22% respectivamente y un 20% de anormalidades electrocardiográficas en los pacientes seropositivos de ambas regiones (Sosa-Jurado F et al. 2003) (Fig. 5).

I.5.1 Reservorios de T. cruzi en México:

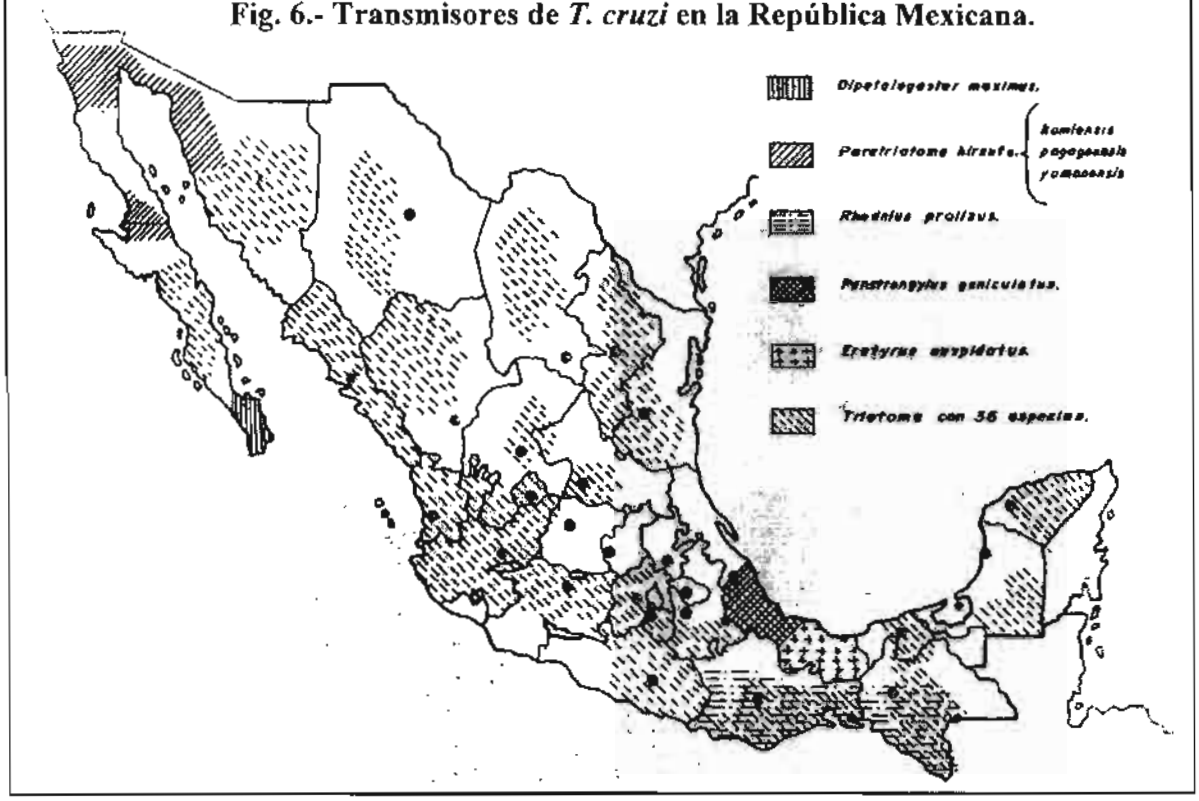
Por otro lado, se reporta que los principales reservorios naturales del parásito en la República Mexicana son *Didelphys marsupialis*, tlacuache; *Dasypus novemcinctus maximus*, armadillo; *Cannis familiaris*, perro (Tay J et al. 1980) y *Rattus norvegicus*, rata (Beltran E, 1949). En 1979, Tay y colaboradores (Tay J et al. 1979) encuentran en Jalisco dos reservorios naturales mas: *Mus musculus* y *Scirus vulgaris* (ratón y ardilla) y encuentran resultados negativos en *Cannis familiaris.* Como se observa, estas especies presentan una amplia distribución en la República Mexicana, lo cual sugiere que el vector infectado se presenta en cualquier parte del territorio nacional.

I.5.2 Transmisores de T. cruzi en México:

Los insectos hemípteros de la familia *Triatomineae*, conocidos comúnmente como chinches besuconas, son los transmisores del parásito. En este sentido, se sabe que dichos insectos se encuentran ampliamente distribuidos en México, aunque la mayoría de ellos se ubican en la vertiente del Pacífico y en altitudes de 0 a 1800 metros sobre el nivel del mar (Tay J et al. 1980), lo cual indica que las zonas endémicas de la enfermedad abarcan un gran territorio sobre el área nacional (Figura 6). En la República Mexicana se conocen 6 géneros de triatóminos que actúan como transmisores de la enfermedad de Chagas: *Triatoma* con 36 especies y subespecies distribuidas en la República; *Dipetalogaster* con la especie *maximus*; *Rhodnius prolixus; Paratriatoma* con las especies *hirsuta cuspidatus, h. yumanensis* e *h. kamiensis; Panstrongylus*

geniculatus y *Eratyrus cuspidatus*; estos dos últimos en Veracruz (Figura 6). Estos triatominos pueden colectarse para su estudio en forma silvestre en madrigueras de algunos animales e incluso en casas habitación rurales o en el momento preciso en que se alimentan con sangre en

Fig. 6.- Transmisores de *T. cruzi* en la República Mexicana.



personas dormidas y se ha demostrado que la gran mayoría están infectadas en forma natural por *T. cruzi* (Tay J et al. 1980, Zarate & Zarate, 1980, 1985, Vidal-Acosta et al. 2000).

Datos epidemiológicos llevados a cabo en diferentes regiones de México han revelado una distribución heterogénea de la infección (Tay et al. 1980, Salazar et al. 1988, Velasco-Castrejón 1992). Las zonas endémicas se han encontrado principalmente en las costas y el Sureste de México con alta seropositividad en pueblos rurales e incluso casos con cardiopatía chagásica crónica o CCC (Ruegsegger et al. 1993, Mendoza el al. 1995, Zavála-Castro et al. 1995, Monteón et al. 1996, Hernández-Becerril et al. 2001, Mazariego-Aranda et al. 2001); aunque también se han observado regiones con moderada a baja seropositividad en la parte central de la República Mexicana (Pérez-Fuentes et al. 1998, Rancel-Flores et al. 2001).

I.6 Variabilidad biológica de T. cruzi:

La evaluación de los factores responsables del desarrollo o control de las respuestas patogénicas en la enfermedad de Chagas, se ha visto mermada por la alta variabilidad biológica que exhibe el parásito. Se sabe que existen diferentes cepas de éste protozoario que se comportan de diferente manera en cuanto a su tropismo y virulencia (Andrade y Magalhaes 1996, Tay J et al. 1979). Salazar y colaboradores, (1978), realizaron un trabajo comparativo de la patogenicidad de cuatro cepas mexicanas de *T. cruzi,* observando las curvas de parasitemia producidas en ratones blancos. En este trabajo, los resultados reflejan que el aislado "La cruz", obtenido del transmisor *Triatoma barberi*, produce muy baja virulencia y las tres restantes: "Santa Catarina" y "Zacoalco", aisladas del mismo transmisor, y "Apodaca", obtenida de un caso humano, presentan altos niveles de parasitemia, los cuales concuerdan con los hallazgos histopatológicos e incluso se reportan daños a nivel de sistema nervioso central e hígado que son poco habituales en aislados mexicanos. Así mismo, existen variaciones epidemiológicas y clínicas que se relacionan con los diferentes aislados o subpoblaciones del parásito, además de su permanencia en ciertos órganos y tejidos. De esta manera, se ha detectado, en ratones y de manera experimental, la coexistencia de infección mezclada con cepas diferentes (Y y T) en donde se observa que el proceso de aislado del parásito esta muy influenciado por el tipo de cepa que prevalezca en la composición final de la mezcla de las mismas (Deane MP et al. 1984). Así mismo, se ha reportado que un individuo fue infectado por dos cepas diferentes del parásito que además mostraron diferente tropismo tisular (Vago et al, 2000). Debido a las dificultades obvias para estudiar ésta enfermedad en el humano, diversos investigadores han decidido hacer estudios sobre los mecanismos patológicos de la CCC en modelos de infección en ratones. De tal suerte que a lo largo de varias décadas de

investigación, se ha observado que las características genéticas del parásito, así como también del hospedero, contribuyen al desarrollo de ésta enfermedad. Ciertas cepas de ratón desarrollan CCC después de ser infectados con ciertas cepas del parásito, pero no con otras (Andrade et al. 1985, Andrade 1990). Algunos modelos se acercan más a la enfermedad humana que otros, por ejemplo: ratones BALB/c infectados con 100 tripomastigotes de la cepa Colombiana de *T. cruzi* reproducen las tres fases de la infección observada en humanos (Brener et al. 2000).

XOCHIMILCO SERVICIOS DE INFORMACION
ARCHIVO HISTORICO

II. ANTECEDENTES:

II.1 Patogenia de la enfermedad de Chagas:

Las bases patológicas de la enfermedad de Chagas han sido un tema de amplio debate en las últimas décadas, de tal forma que puede observarse que los daños causados en la fase aguda de la enfermedad pueden ser explicados por la presencia del parásito en tejido. Sin embargo, en la fase crónica la patogénesis es difícil de explicar, pues el daño celular se asocia a infiltrado linfocitario sin presencia del parásito (Vianna GO, 1911; Koberle F and Nador E, 1955). Experimentos realizados en ratones atímicos, en los cuales la infección por *T. cruzi* causa un notable parasitismo tisular sin inflamación cardiaca, han mostrado claramente que un proceso inmunológico puede ser el causante de ésta patología (Soares et al. 2001); sin embargo la especificidad de la respuesta inmune patogénica es fuente de controversias. Por un lado, se propone que la respuesta inflamatoria patogénica está dirigida exclusivamente por antígenos de *T. cruzi* en sitios de persistencia parasitaria (Tarleton 2001, Higuchi 1997); y por otro lado se postula que la CCC es una enfermedad autoinmune disparada en algunos individuos por la infección por *T. cruzi* (Cunha-Neto y Kalil 1995, Leon y Engman 2001).

II.1.1 Hipótesis Toxigénica e Hipersensibilidad Retardada:

Uno de los mecanismos patológicos que se han propuesto para explicar el daño a tejido causado por *T. cruzi*, es el toxigénico. En ésta hipótesis se postula que el parásito puede liberar ciertas toxinas que causan daño neuronal (Koberle F and Nador E, 1955). En 1974, Koberle propone que el daño a tejido es causado indirectamente por el parásito en la fase crónica (Koberle F, 1974). Ribeiro Dos Santos en 1980 y 1981, realiza una serie de experimentos con cardiocitos, a los cuales infecta con tripomastigotes sanguíneos de *T. cruzi* y encuentra antígeno parasitario en la membrana de cardiocitos parasitados y no parasitados,

lo cual indica la presencia de antígenos solubles en el medio que pueden adsorberse a la superficie de las células, con lo cual se establece el daño por hipersensibilidad en los tejidos involucrados (Ribeiro dos Santos and Hudson L 1980, 1981). Posteriormente, en un estudio realizado en 1985, Araujo encuentra antígeno en la membrana de células infectadas y no infectadas, así como también que una población rica en linfocitos T de ratón infectado con *T. cruzi*, es capaz de reconocer antígeno adsorbido en la superficie de células parasitadas y no parasitadas y destruirlas, con lo que sugiere que la hipersensibilidad es un mecanismo accesorio de la patogénesis y no la única o principal causa de daño (Araujo F 1985). La reacción inflamatoria observada en la CCC tiene un aspecto parecido a la hipersensibilidad de tipo retardado (HR) y es de tipo focal compuesta principalmente por células mononucleares, como ya se ha dicho con anterioridad. Este tipo de reacciones sugiere la participación de células tipo Th1 en la patogénesis de esta enfermedad. De hecho, se ha observado una asociación entre la intensidad de la CCC y la producción de altos niveles de IFN-γ en la infección humana (Bahia-Oliveira et al. 1998). Ratones BALB/c deficientes para producir IL-4, en los cuales se acentúa la respuesta tipo Th1, se infectaron con la cepa Colombiana de *T. cruzi* para observar el papel del IFN-γ secretado por células T en la CCC. Se observó que dichos ratones desarrollan una gran parasitemia en la fase aguda de la enfermedad, además de parasitismo tisular y altos niveles de IFN-γ al compararlos con ratones BALB/c normales. Interesantemente también se observó miocarditis intensa a pesar del bajo número de parásitos observados en comparación con los controles (Soares et al. 2001). Estos resultados indican un papel dual de IFN-γ en la infección por *T. cruzi*. Un papel protector en el control de la parasitemia y como mediador crítico en el desarrollo de la CCC. Por otro lado, González y colaboradores en 1987, estudiaron esta enfermedad en ratones Rockland, que presentan parasitemia persistente y escasos amastigotes en tejido cuando se infectan con *T. cruzi*, y encontraron miositis y neuritis intramuscular con desinervaciones a los 4 y 12 meses

postinfección, con un proceso de reinervación lento que indica la presencia de un mecanismo de homeostasis dentro de la patogenia de esta enfermedad (Gonzalez SM et al. 1987).

II.1.2 Hipótesis Autoinmune:

Otro mecanismo de patogenicidad dentro de ésta enfermedad, el autoinmune, sugiere que puede existir un tipo de reactividad cruzada entre antígenos del parásito y del huésped. Este mecanismo lo propone Cossio al encontrar, en sueros de chagásicos, anticuerpos capaces de tener reactividad hacia endotelio de vasos sanguíneos, intersticio y endocardio. Este tipo de anticuerpos, a los cuales denomina EVI, se analizan por IFI en hígado y corazón de humano, bovino y ratón, resultando positivos en 24 de 25 pacientes chagásicos (Cossio PM et al. 1974); sin embargo, estudios posteriores demostraron que los anticuerpos "EVI" no son característicos de la enfermedad de Chagas, pues también se encuentran en otro tipo de enfermedades e incluso en un 2% de individuos sanos (Hubsch R et al. 1976). Por otro lado, se reportó la naturaleza heterofílica de los anticuerpos EVI, al observar su reactividad sólo hacia tejidos animales y no hacia tejido cardiaco humano, así como también que esta reactividad se pierde al adsorber los sueros con eritrocitos, extracto de hígado y riñón de cobayo (Khoury I et al. 1983). En 1984, Borda encuentra la presencia de IgG que estimula la tensión y frecuencia de la contracción del atrio de la rata en individuos chagásicos asintomáticos. La reactividad disminuye al adsorber el suero con eritrocitos de guajolote, que son ricos en adrenoreceptores β-1; y al adsorber con eritrocitos de cobayo no hay pérdida de la reactividad, por lo cual, estos anticuerpos son independientes de los EVI y tal vez participen como bloqueadores "naturales" β-1 adrenérgicos (Borda J et al. 1984), aunque ahora se pone en duda su participación en la patogenia chagásica, pues dañan la función cardiaca, pero provienen de individuos chagásicos asintomáticos. La producción de autoanticuerpos contra adrenoreceptores β1 y β2 correlaciona con las anormalidades

eléctrico-cardiacas primarias (Chiale et al. 1995), lo cual ha sido demostrado *in vitro* al observar que el suero de pacientes chagásicos crónicos interfiere con la actividad mecánica y eléctrica de células cardiacas embrionarias (Costa et al. 2000, Kaplan et al. 1997) y afectan la electrogénesis cardiaca y de conducción al ser perfundidas en corazón de conejo (De Oliveira et al. 1997). Estas alteraciones en las funciones de células cardiacas parecen resultar de la unión de anticuerpos anti receptores β-adrenérgicos y M2-colinérgicos de la superficie celular del miocardio; de tal forma que la producción de anticuerpos contra estructuras propias altera las funciones de las células cardiacas iniciándose así complicaciones asociadas a la CCC.

Se han encontrado linfocitos T autoreactivos a antígenos específicos de corazón y tejido nervioso tanto en animales como en humanos (Rizzo et al. 1989, Cunha-Neto et al. 1996, Hontebeyrie-Joskowicz et al. 1987). En un modelo experimental, se transplantaron corazones de ratones singénicos recién nacidos en ratones infectados con *T. cruzi* y en ratones normales. Los injertos fueron rechazados en los ratones infectados y en los normales tuvieron éxito comenzando a latir a los 7 o 10 días (Ribeiro-dos Santos et al. 1992). El rechazo de los corazones transplantados fue mediado por linfocitos T $CD4^+$. Se purificaron subpoblaciones de células T $CD4^+$ de bazo de ratones infectados y se transfirieron a ratones normales, los cuales fueron capaces de rechazar el injerto cardiaco singénico. Tarleton et al. (1997) estudió el rechazo de transplantes cardiacos singénicos en diferentes modelos murinos de infección (usando las cepas Brazil y Sylvio de *T. cruzi* para infectar a ratones C57B16 y C3H) y observó que no hay rechazo en ratones chagásicos crónicos. El rechazo sólo se observó cuando el injerto se llevó a cabo durante la fase aguda de la enfermedad (y se podían encontrar parásitos en el injerto), o cuando se inyectó antígeno de *T. cruzi* en el tejido transplantado. Estos resultados indican que una respuesta anti- *T. cruzi* es responsable de la destrucción del transplante cardiaco. Sin embargo, se ha observado que la respuesta inmune parásito específica no es la única causa de CCC en otro tipo de modelos murinos (Ribeiro-dos

Santos et al. 1992, Buckner et al. 1999) e incluso en humanos (Barbosa Jr. and Andrade 1984, Mortara et al. 1999).

Para demostrar el papel autoreactivo de las células T en la patogénesis de la CCC experimental, se generó una línea de células $CD4^+$ obtenidas de bazo de ratones chagásicos crónicos, la cual fue cultivada y estimulada con extracto de corazón singénico. Después de ocho meses de cultivo dicha línea celular reaccionó fuertemente en contra de extractos de corazón de diferentes fuentes (singénico, alogénico y xenogénico). Además, también reaccionó con antígeno de *T. cruzi*, aunque el cultivo se mantuvo libre de parásitos por tratamiento con Anfotericina B. Dicha línea celular anti-corazón causó destrucción de mioblastos *in vitro* así como rechazo del transplante cardiaco singénico cuando fue inyectada en el mismo transplante (Ribeiro-dos Santos et al. 2001). Por otro lado, presentó un perfil de citocinas tipo Th1 al ser estimulada con antígeno de *T. cruzi* y con antígenos cardiacos, además de inducir una miocarditis severa al ser transferida a ratones atímicos (nu/nu) no infectados con el parásito, los cuales son extremadamente sensibles a la infección por *T. cruzi*.

II.1.3 Miocarditis Autoinmune:

La reacción inflamatoria encontrada en la CCC es muy similar a la miocarditis autoinmune generada por inmunización con miosina cardiaca, la cual se caracteriza por infiltrado inflamatorio multifocal compuesto por células mononucleares y fibrosis intersticial. Leon et al. (2001) demostraron que el suero de ratones A/J (altamente susceptibles a desarrollar miocarditis autoinmune) presenta anticuerpos que son fuertemente reconocidos por antígenos cardiacos, incluyendo miosina, en la fase aguda de la infección por *T. cruzi*. Además, dichos ratones desarrollaron HR contra miosina cardiaca, lo cual sugiere que *T. cruzi* induce una respuesta autoinmune durante la infección temprana. Por otro lado, en un modelo experimental usando ratones A, que son muy susceptibles a la infección por *Trypanosoma*

cruzi, los cuales fueron tratados con benznidazole desde el inicio de la infección con éste parásito, se observa que, además de sobrevivir a la infección con la cepa Colombiana de *T. cruzi*, desarrollan una intensa miocarditis a los tres meses postinfección. En cambio, ratones BALB/c infectados con la misma cepa de *T. cruzi* apenas desarrollan una leve inflamación en el mismo periodo de tiempo, lo cual sugiere que ambas enfermedades pueden tener una base común de desarrollo. La hiperinmunización de ratones BALB/c deficientes en producir IL-4 (IL-4 -/-) con bajas dosis de antígenos cardiacos, desarrollan una miocarditis de mediana intensidad, sin embargo ésta se agrava al infectar a los ratones con *T. cruzi* (Soares et al. 2001b). Una explicación de éste fenómeno es que la infección por *T. cruzi* rompe la tolerancia a antígenos cardiacos, lo cual puede estar controlado por un mecanismo dependiente de IL-4.

El principal mecanismo por medio del cual un microorganismo puede desencadenar una enfermedad autoinmune es el mimetismo molecular, es decir, compartir epitopes entre el patógeno y el hospedero, de tal suerte que la inflamación y el daño a tejidos se genera por liberación de antígenos propios, reclutamiento de células inflamatorias y/o producción de inmunomoduladores y expresión de moléculas de superficie, las cuales pueden disparar o sostener una respuesta autoinmune (Davies 1997, Fairweather et al. 2001). Se han encontrado anticuerpos que reaccionan tanto en contra de miosina cardiaca, como en contra de la proteína B13 de *T. cruzi* en pacientes con CCC. Así mismo, se han obtenido clonas de células T de pacientes con CCC, que tienen reacción cruzada con miosina cardiaca y B13 (Cunha-Neto et al. 1995, 1996). La mayoría de éstas clonas son $CD4^+$ y secretan altos niveles de IFN-γ (Abel et al. 2001).

Trypanosoma cruzi puede disparar o potenciar una respuesta inmune autoreactiva y mantenerla bajo control por mecanismos supresores. Esto es, puede infectar fibras cardiacas y causar un intenso daño, con lo cual se liberan antígenos y se produce inflamación en la fase aguda de la enfermedad. Posteriormente, el parásito es capaz de alterar las propiedades de las

células presentadoras de antígeno, como macrófagos y células dendríticas. En este sentido, se ha demostrado que moléculas de *T. cruzi* pueden modular la producción de citocinas proinflamatorias producidas por los macrófagos (Almeida et al. 2000) y afectar la maduración de células dendríticas (Van Overtvelt et al. 1999). Por último, la respuesta inmune contra antígenos de *T. cruzi* puede influenciar la inducción de respuestas autoreactivas. En la infección experimental con éste parásito, se ha observado que se producen niveles muy altos de IFN-γ durante la fase aguda de la enfermedad (Hoft et al. 1993, Zhang y Tarleton 1996). La alta producción de IFN-γ podría deberse a que el parásito estimula intensamente a los macrófagos para producir IL-12 e IL-18, las cuales son dos potentes factores inductores de ésta molécula (Frosch et al. 1996, Meyer zum Büschenfelde et al. 1997, Camargo et al. 1997). Por otro lado, la superfamilia de antígenos inmunodominantes trans-sialidasa de *T. cruzi* induce una respuesta de tipo Th1 tanto en ratones como en el humano (Millar and Kahn 2000, Ribeirao et al. 2000). Así, la persistencia del parásito puede sostener la liberación de antígenos propios, la presencia de pequeños focos inflamatorios en el corazón y la producción de citocinas inflamatorias, las cuales de hecho potencian una respuesta autoreactiva. La posibilidad de una re-infección con *T. cruzi* en los individuos que habitan en zonas endémicas de esta enfermedad, puede provocar el desarrollo de la CCC, pues nuevas cargas parasitarias pueden llegar a inducir la liberación de autoantígenos y mediadores solubles. De hecho, se ha reportado que la frecuencia de individuos infectados para desarrollar CCC disminuye notablemente en áreas en donde se ha controlado y disminuido la transmisión el parásito (Dias and Coura 1997).

II.2 Citocinas en la Enfermedad de Chagas:

La gran mayoría de estudios que se han elaborado para observar el papel que juegan las citocinas en ésta enfermedad, han utilizado modelos murinos y cultivos celulares para

desarrollar en ellos la tripanosomiasis experimental. En estos trabajos se ha observado el papel de las citocinas en la regulación de la replicación del parásito y en la respuesta inmunológica del animal infectado, sobre todo, en la fase aguda de la enfermedad.

Se sabe que las citocinas implicadas en una respuesta inmune de tipo Th1 son la interleucina 2 (IL-2), IL-12, interferón gama (IFN-γ) y factor de necrosis tumoral alfa (TNF-α); mientras que IL-4, IL-6 e IL-10, son características de una respuesta tipo Th2 (Mosmann TR et al. 1996). En este sentido, se dice que la resistencia a parásitos intracelulares está asociada a un patrón de respuesta tipo Th1, mientras que la susceptibilidad se relaciona con una respuesta inmune tipo Th2. Por otro lado, las enfermedades infecciosas crónicas tienden hacia una polarización de la respuesta inmune de un solo tipo de citocinas (Th1 o Th2) en respuesta específica al patógeno (Zhang J et al. 1997). Sin embargo, en la gran cantidad de información que se ha generado con respecto al perfil de citocinas observado en la enfermedad de Chagas, no se ha detectado una polarización de la respuesta inmune hacia algún tipo preferente de citocinas.

Se ha detectado secreción de IFN-γ en ratones infectados con *T. cruzi*, al día 9 postinfección y aumenta con respecto al tiempo, además se observa que los macrófagos peritoneales contribuyen a la producción de esta citosina desde el día 4 postinfección, al igual que las células NK (Reed SG et al. 1994, Nabors GS et al. 1991, Silva JS et al. 1992, Cardillo F et al. 1996). El IFN-γ tiene un papel fundamental en la regulación de la replicación de parásitos internalizados en macrófagos y en general en el curso de la infección, pues es el responsable de la activación de macrófagos, los cuales a su vez llevan a cabo la presentación de antígenos por moléculas clase II del SPH, la liberación de productos germicidas como el peróxido de hidrógeno y proteasas; además de expresar la sintasa de óxido nítrico inducible (iNOS) requerida para la producción de óxido nítrico (Biron CA et al. 1995).

La IL-2 es una citosina tipo Th1 que está involucrada en la resistencia contra parásitos, debido a que es uno de los principales inductores de proliferación de linfocitos T cooperadores (T_H) y T citotóxicos (T_C), además promueve la actividad de células NK. Sin embargo, se ha observado que las células T de animales infectados con *T. cruzi* producen bajos niveles de ésta citocina, por lo cual se ha pensado que dicho parásito provoca la incapacidad en los linfocitos para producirla (Majurmder S et al. 1995). Otras hipótesis que tratan de explicar la baja producción de IL-2 en la fase aguda de la enfermedad, postulan que puede haber supresión general de células Th1 por inducción de anergia (Silva JS, 1991) o falta de expresión de receptores para esta citocina en células T y B (Mejía LH et al. 1993). Se ha observado la ausencia de IL-2 en esplenocitos, células linfoides, sangre periférica y corazón de animales y pacientes infectados con *T. cruzi*, por diferentes metodologías (Zhang L et al. 1996, Majurmder S et al. 1995, Eksi S et al. 1996, Dutra JO et al. 1997), además de que la restauración exógena de la misma, en ratones chagásicos, regenera su respuesta inmunológica (Majurmder S et al. 1995).

Otra de las citocinas importantes que participan en la respuesta inmune contra alguna infección, es la IL-12. Se ha observado que dicha interleucina es sintetizada por macrófagos estimulados con amastigotes o tripomastigotes sanguíneos vivos. A su vez, IL-12 induce la producción de IFN-γ, la proliferación de células NK y la citotoxicidad mediada por linfocitos T_C, aumentando la respuesta inmune endógena contra infecciones. Así pues, se ha observado que IL-12 es responsable de la producción temprana de IFN-γ observada durante la infección y, por tanto, del subsecuente control de la proliferación del parásito *in vivo* (Aliberti JC et al. 1996). Se ha observado que la administración de esta citosina tiene un efecto protector en modelo murino, mientras que anticuerpos contra IL-12 incrementan la susceptibilidad a la infección con *T. cruzi*. Sin embargo, altas concentraciones de ésta citosina provocan el

aumento de infiltrados inflamatorios en el corazón y muerte prematura (Scott P. 1993, Silva JS et al. 1998).

Por otro lado, IL-4 puede sinergizar con IL-10 convirtiéndose en un poderoso modulador de la secreción de IFN-γ y de la activación de células tipo Th1 durante la infección aguda con *Trypanosoma cruzi* (Abrahamsohn IA et al. 2000), aunque *per se* ésta citosina no sea un importante regulador de la producción de IFN-γ o un determinante de susceptibilidad en la fase aguda de la enfermedad. En cuanto a las citocinas involucradas en la susceptibilidad, IL-10, que es un antagonista de citocinas activadoras de macrófagos y que inhibe la producción de TNF-α, IL-12 por macrófagos y de IL-2 e IFN-γ por linfocitos (Mosmann TR, 1994), tiene un papel complejo y contradictorio; por un lado permite la proliferación parasitaria y por otro, la falta total de IL-10 se asocia con patología debida a una respuesta Th1 exagerada, es decir, que existe un requerimiento mínimo de IL-10 para prevenir el desarrollo de una respuesta inmunológica patológica asociada con linfocitos T CD4+ y sobreproducción de IL-12 en la fase aguda de la enfermedad (Hunter CA et al. 1997).

En resumen, la participación de citocinas durante el desarrollo de la enfermedad de Chagas ha sido estudiada en modelos experimentales de infección por *Trypanosoma cruzi*, sobre todo en fase aguda. Dichos estudios han mostrado que la resistencia al parásito está asociada con la producción temprana de citocinas tipo Th1 como IL-12 e IFN-γ, y el retraso en la producción de éstas citocinas puede determinar la falta de control de la infección en la fase aguda de la enfermedad, además, el cese de producción temprana de IL-2 genera la supresión de linfocitos T CD4+ tipo 1, lo cual provoca un aumento de citocinas tipo Th2 como IL-10, IL-4 y TGF-β, que están estrechamente relacionadas con la susceptibilidad a la infección, por un lado, y también son importantes moduladores de una respuesta exagerada de citocinas tipo Th1 como la IL-2, IFN-γ y TNF-α, éste último muy relacionado con el desarrollo de Cardiomiopatía Dilatada en la fase crónica de ésta enfermedad (Zhang L etal.

1996,). Lo anterior puede darnos una idea de que no existe un patrón de citocinas polarizado en ninguna fase de la enfermedad de Chagas y que la alternancia de éste tipo de respuestas inmunes (Th1 y Th2) debe controlar la multiplicación intracelular del parásito, por un lado, y la respuesta inmunológica del hospedero, por el otro, para evitar así la inmunopatología cardiaca.

Finalmente, en algunos trabajos realizados en pacientes chagásicos crónicos el TNF-α ha sido implicado en la resistencia, así como en la generación de daño tisular. El TNF-α es una citocina pro-inflamatoria con importante efecto inmuno modulador en diversos procesos patológicos. Algunos estudios en pacientes chagásicos han reportado un incremento considerable de los niveles séricos de TNF-α e incluso una sobre expresión de ésta citocina en linfocitos de dichos pacientes (Menezes CA et al. 2004, Ferreira RC et al. 2003). Talvani y colaboradores reportaron una alta correlación entre los niveles de TNF-α y la disfunción cardiaca (Talvani A et al. 2004). El TNF-α es expresado por el hospedero en respuesta a la infección y es un factor crítico en el desarrollo a la cronicidad en pacientes infectados con *T. cruzi*, cuando se acumula y persiste en los tejidos. Estudios experimentales han revelado que una alta producción de TNF-α en órganos blanco es responsable, al menos en parte, de la severa patología asociada a la fase crónica de ésta enfermedad (Lima ES et al. 2001, Derouich-Guergour D et al. 2001). Estas observaciones nos dan la posibilidad de pensar que las formas cardiacas de la Enfermedad de Chagas están relacionadas con una predisposición genética de los individuos para producir TNF-α. En este sentido, se ha observado que el polimorfismo del promotor de TNF-α tiene un efecto importante sobre la actividad transcripcional del mismo gen (Wilson AG et al. 1997, Kroeger KM et al. 1997, Braun N et al. 1996).

La característica más intrigante de la CCC es el hecho de que la mayoría de individuos infectados con *T. cruzi* sobreviven y pasan el resto de sus vidas sin presentar alguna

manifestación de la enfermedad. Como se ha revisado, la conjugación de algunos factores puede permitir que dichos individuos permanezcan en la fase indeterminada de la enfermedad por muy largo tiempo. Esto es, que hayan sido parasitados por una cepa no virulenta de *T. cruzi,* que el número de re-infecciones haya sido escaso o nulo, que haya tenido un buen tratamiento médico en una etapa oportuna e incluso que su constitución genética les confiera cierta protección a desarrollar la fase crónica de dicha enfermedad.

En éste último punto, se ha descrito que la capacidad de resistencia de un individuo a determinado microorganismo puede estar programada por el sistema principal de histocompatibilidad (SPH) y los productos de sus genes (HLA). Además, es muy probable que futuras aproximaciones científicas puedan establecer, de manera más clara, el poder de resistencia de un individuo hacia ciertos microorganismos con relación a su constitución genética.

El repertorio de antígenos HLA, de manera individual, determina la capacidad de la respuesta inmune y, por lo tanto, define la susceptibilidad genética a ciertas enfermedades. A la fecha, se han asociado más de 40 patologías con loa antígenos HLA. Se conoce que el HLA B27 constituye un factor de riesgo para el desarrollo de la espondilitis anquilosante, el HLA DR4 para artritis reumatoide y así existen otros ejemplos (Tabla I). Esta asociación puede reflejar ya sea el compromiso de la proteína del HLA, o el desequilibrio de ligamiento entre varios genes, que faciliten el desarrollo de la entidad (Williams TM, 2001).

II.3 Sistema Principal de Histocompatibilidad:

El sistema principal de histocompatibilidad (SPH) comprende una serie de genes estrechamente relacionados cuyos productos están comprometidos con la regulación de la respuesta inmune. Cada uno de estos genes es extraordinariamente polimórfico y son heredados de manera mendeliana codominante; lo cual ha permitido que sean usados como

marcadores genéticos en el estudio de las enfermedades y también se han empleado en la caracterización de la estructura genética de algunas poblaciones y en la selección de individuos candidatos como donadores para transplante de órganos (Duquesnoy RJ, 1991).

El SPH se encuentra localizado en el brazo corto del cromosoma 6 humano, en la porción distal de la banda p21.3. Este sistema se ha dividido en tres grupos en base a las características estructurales y funcionales de los productos de sus genes. La región clase I del SPH (Figura 1), se localiza hacia el telómero y está constituida al menos por 17 genes relacionados entre sí, e incluye los loci HLA-A, HLA-B, HLA-C, HLA-E, HLA-F, HLA-G Y HLA 9.2 p. Hacia el centrómero está la región clase II, que se divide

TABLA 1. Enfermedades asociadas a distintos tipos de antígenos HLA.

Enfermedad	***HLA***	***Enfermedad***	***HLA***
Espondilitis anquilosante	B27	Enfermedad de Addison	B8
Enfermedad de Reiter	B27	Esclerosis múltiple	B7-DW2
Artritis psoriásica	B13-B27	Enfermedad celíaca	B8
Artritis Reumatoide juvenil	B27-B15	Hepatitis crónica activa	B8
Uveitis aguda anterior	B27	Miastenia grave	B8
Psoriasis vulgar	B13-B17-B27	Síndrome de Sjögren "Sicca"	B8
Dermatitis herptiforme	B8	Enfermedad de Behçet	B5
Diabetes insulino-dependiente	B8-B15-B18	Enfermedad de Hodgkin	A1-B5-B8-B18
Tirotoxicosis	B8		

en cuatro subregiones (DP, DO/DZ, DQ y DR), cada una por lo menos con un par de genes α y β; además encontramos a los genes TAP (Transportador de péptidos inmunogénicos) y LMP (Proteasas; proteínas del proteosoma). Entre las regiones clase I y clase II, se encuentra la región clase III, cuyos genes codifican para los componentes del complemento C2, factor B (fb), C4A y C4B, así como los genes estructurales de la 21-hidroxilasa A y B (21-OHA y 21-OHB)(Weeckman AC et al. 1997).

Dentro del SPH se incluyen el gen de la glicoxilasa I, el más centromérico de todos, así como los genes del factor de necrosis tumoral (TNF) α y β (Trowsdale J et al. 1987), que están entre el HLA-B y la región de clase III. Recientemente se han encontrado otros cinco genes asociados con el locus HLA-B, llamados "transcritos asociados" a B, que se designan como BAT-1,-2, -3, -4 y –5. En 1989 se detectaron dos loci de la proteína de choque térmico HSP70 (HSP70-1 y HSP70-2) situados entre los genes de clase III y el TNFα (Sargent CA et al. 1989).

Las moléculas clase I se expresan en la membrana de todas las células nucleadas, excepto en neuronas y trofoblastos maduros y son difíciles de detectar en eritrocitos. De los tres loci de clase I clásicos, HLA-A, -B y –C, el locus de C es el que menos adecuadamente se expresa. Las moléculas clase II se expresan sólo en células como macrófagos, linfocitos B, células endoteliales, células dendríticas y células de Langerhans. No se expresan en eritocitos maduros, granulocitos (Bell DA, 1980) ni en linfocitos T no activados, pero su expresión puede inducirse con mitógenos o estímulos antígeno-específico. Los eritrocitos maduros y los granulocitos no expresan moléculas de clase II (Cavelli S et al. 1980).

La frecuencia de recombinación genética dentro del SPH es muy baja (menos del 2%) debido a que este conjunto de genes ocupa solamente unas 3,800 kb. El entrecruzamiento entre cromosomas homólogos que incluya a los genes HLA-A y –B ó a HLA-B y –DR ocurre

con una frecuencia un poco menor de 1% del total de meiosis. Por esta razón el complejo génico puede considerarse como una sola unidad genética (Alper CA et al. 1982).

Los alelos de los loci del SPH de un cromosoma en particular constituyen un haplotipo (el genotipo de un individuo está dado por dos haplotipos, uno de origen materno y otro de origen paterno). Una combinación dada de alelos de los loci fB, C2, C4A y C4B conforman el complotipo o haplotipo de genes del complemento (Wamonn WR, et al. 1982).

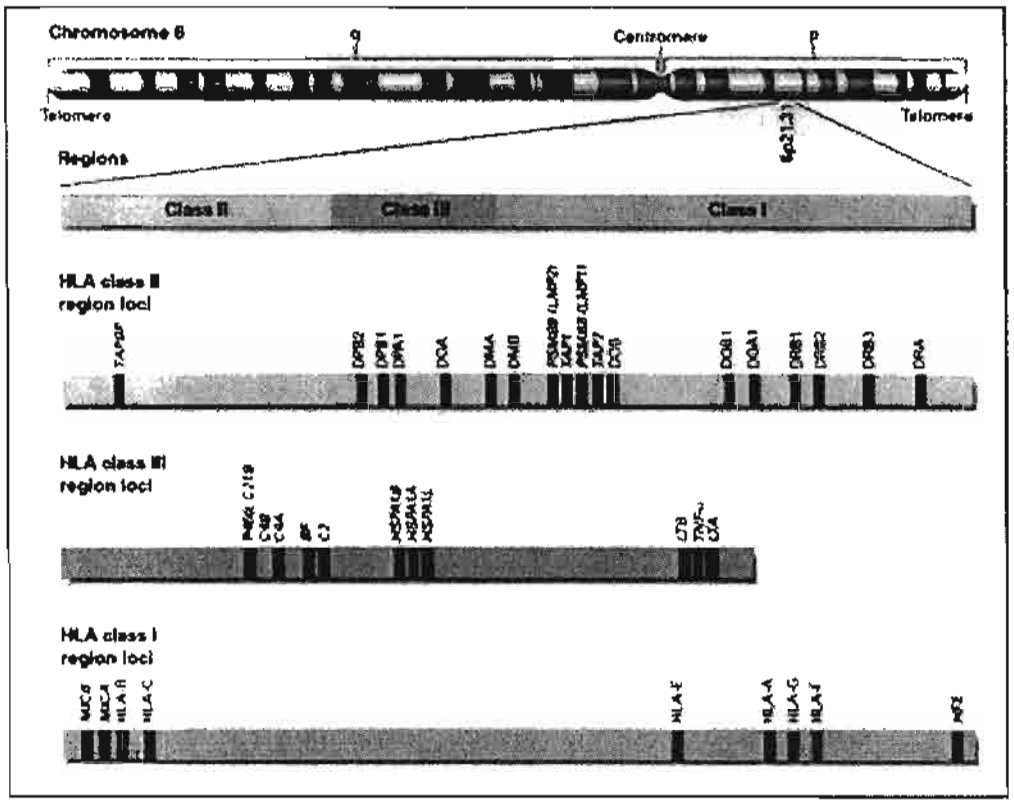


Figura 7. Mapa genético del Sistema Principal de Histocompatibilidad humano.

II.3.1 Genes Clase I:

Las moléculas de clase I, se encuentran en todas las células nucleadas y plaquetas del organismo, razón por la cual su presencia es nula en los glóbulos rojos, su expresión es intensa en las células linfoides, menos intensa en el hígado, riñón y pulmón y escasa en el

cerebro, músculo esquelético y trofoblasto velloso (Krensky AM, 1997). Esta distribución tan general en estos tejidos implica que actúan como marcadores de reconocimiento de lo propio, condición necesaria para que el organismo distinga los agentes extraños de los propios, y se defienda contra ellos. Su expresión es coordinada: A, B y C, se expresan al mismo tiempo en la superficie celular (Amich S y Prieto S, 2001). Koller y colaboradores, (1989) construyeron un mapa de los genes clase I, que incluye 6 loci: HLA-A, HLA-B, HLA-C; HLA-E, HLA-F, HLA-G y HLA-9.2p ocupando en total 11 centimorgans.

Los principales locus son, HLA- A, B y C llamados clásicos y comprenden una extensión de 2000 Kb, separados entre sí por largas fibras de ADN, y su función es, presentar péptidos de 8 a 10 aminoácidos de largo a los linfocitos T, los cuales participan en el reconocimiento, rechazo y destrucción de virus e injertos de tejido extraño (Krensky AM, 1997).

La identificación serológica de las moléculas clase C ha sido difícil e imprecisa, sin embargo estas parecen ser muy importantes en la interacción con las células asesinas (NK). Existen otros locus menos polimórficos que se expresan poco, los cuales son HLA-E, F, G, H, y J, cuyas funciones aún no están bien establecidas, aunque algunas evidencias y la restricción tisular del HLA-G, sugieren la participación de éstas moléculas en la tolerancia materno-fetal (Choo SY, 1991).

Los antígenos de clase I son mediadores de la eliminación alogénica y de la restricción de linfocitos T efectores. Se constituyen en un par de cadenas polipeptídicas unidas no covalentemente: una cadena pesada α, que es glicoproteínica, transmembranal de 45 kilodaltones (kd) y una cadena ligera β, también glicoproteínica, de 12 kd. La cadena α es polimórfica y es codificada por el HLA-A, -B ó –C y la cadena β, monomórfica, es la beta2-microglobulina (Bjorkman et al. 1987), codificada por un gen en el cromosoma 15 (Figura 8).

XOCHIMILCO SERVICIOS DE INFORMACION
ARCHIVO HISTORICO

La estructura de los antigenos de clase I del SPH, se dedujo inicialmente a partir de la determinación de la secuencia de aminoácidos del material purificado de una línea celular humana linfoblastoide. Estas moléculas tienen dominios extracelulares, una región transmembranal y una cola citoplásmica corta. Se ha podido encontrar además la estructura tridimensional de una molécula clase I, el antígeno HLA-A2 por medio de cristalografía de rayos X (Saper MA et al. 1991).La cadena pesada α consta de tres dominios externos (α1, α2 y α3). Los dominios α1 y α2 son los más distales a la membrana celular y son los que contienen los residuos polimórficos que conforman el sitio de unión a un antígeno, y así son presentados por la molécula del HLA al receptor del linfocito T (Bjorkman et al. 1987).

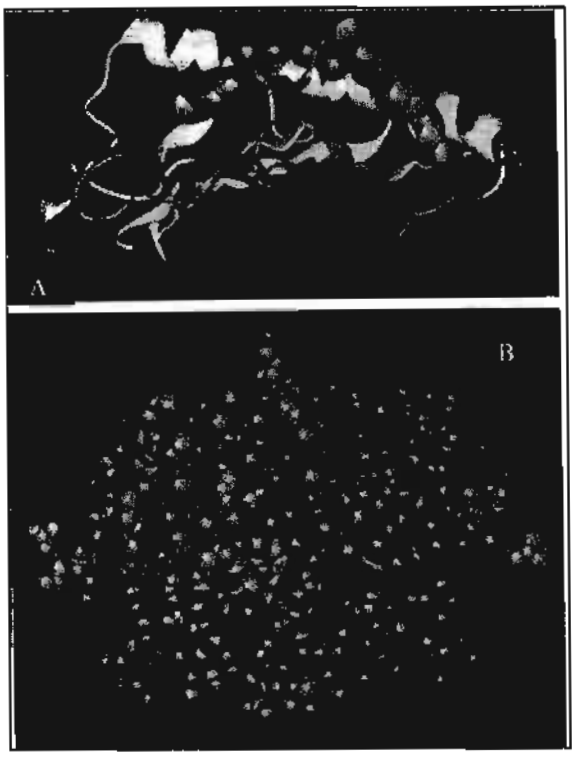


Figura 8. Molécula HLA Clase I. A) Alfa-hélices y beta-plegada para unión al péptido. B) Estructura tridimensional. Péptido en color rosa. Vista superior

II.3.2 Genes Clase II:

El sistema clase II está subdividido en varios grupos: Los HLA-DR, DQ, DZ, DO, DP, DM, y DN. En el humano se han definido bioquímicamente tres isotipos de las moléculas clase II, DR, DQ y DP, que son coexpresados en la superficie de las células presentadoras de antígeno. Cada una de ellas constituida por un dímero: DR alfa/ DR beta, DQ alfa/DQ beta y DP alfa/DP beta. Algunos individuos expresan además un cuarto producto denominado DRw52, DRw53 o DRB51; además de los genes TAP1 y TAP2 y los genes LMP2 y LMP7 (Brown JH et al. 1993).

Los antígenos de clase II son determinantes primarios en la generación de respuestas proliferativas de linfocitos T en cultivo mixto celular y pueden presentar antígenos al receptor de linfocito T CD4+. Se constituyen de cadenas glicoproteínicas, unidas no covalentemente, una pesada α monomórfica, de 33 kd y una cadena ligera β polimórfica, de 28 kd, ambas codificadas por el loci del HLA (Giles RC and Capra JD 1985).

La molécula de clase II tiene cuatro dominios externos: α1, α2, β1 y β2, análogos a los dominios α1, α2, α3 y a la β2-microglobulina, de la molécula de clase I, respectivamente. Los dominios α2 y β2 son del tipo de las inmunoglobulinas, muy conservados y los dominios α1 y β1 son polimórficos. No se ha deducido la estructura tridimensional, por cristalografía de rayos X, de las moléculas de clase II, pero se ha propuesto un modelo parecido al de la estructura de la molécula de clase I (Figura 9).

La molécula de clase II tiene asociada a las cadenas α y β una glucoproteína transmembranal de 31 Kd, conocida como cadena gamma o cadena invariante. Esta cadena no se detecta con anticuerpos en la superficie celular, por lo que se piensa que se asocia al complejo entre el paso por el aparato de Golgi y el arribo a la membrana celular.

De las cuatro subregiones de los genes de las moléculas de clase II, la subregión DP consta de dos pares de loci α y dos β, de los cuales DPα2 y DPβ2 parecen ser pseudogenes (genes que no codifican para proteínas). La subregión DZ/DO se constituye de los genes DZα y DOβ, pero como estos dos loci están separados por varios cientos de kilobases, quizá no forman un dímero α/β.

La subregión DQ tiene dos genes α y dos β: incluye dos genes DX (α y β) y un gen DVβ entre los genes DQ y DX. La subregión DR tiene cuatro genes β: el β1 codifica para las variantes de DR de DR1 a DR18, el β2 es pseudogen, el β3 codifica para el determinante DRW 52 y el β4 para el determinante DRW 53, hay un gen DRα no polimórfico. Se expresan

tres tipos de productos de clase II: DP, DQ y DR. No hay evidencias de que DZα y DOβ se expresen como proteínas, aunque se ha encontrado RNA mensajero normalmente poliadenilado, de ambos genes en células B. Pueden formarse pares de cadenas de DQα y DQβ en "trans", es decir, la cadena α1 y β1 codificadas cada una por cada uno de los cromosomas homólogos de un individuo. También se pueden combinar productos de los diferentes loci, como DRα y DQβ , en ratones transfectados (Giles RC and Capra JD 1985).

Los genes de la región D son los llamados, hasta hace poco, "genes IR"(de respuesta inmune). El HLA DM participa en el proceso de liberación, transporte y ensamblaje del péptido exógeno al complejo. El HLA DZ, al parecer, tiene genes incompletos que no se expresan, o que solo lo hacen en células muy especializadas aún no identificadas. El HLA DP se encuentra en las células presentadoras de antígeno, y estimulan a los linfocitos T, participan en la presentación de antígenos de influenza y *Herpes simplex* y se ha encontrado asociada a artritis reumatoide juvenil y a infecciones por *Onchocerca valvulus* (Corzo D et al. 1995; Meyer CG et al. 1996).

El HLA DO frena la presentación de antígenos a los LT-CD4+ actuando sobre las moléculas HLA DM a las cuales inhiben impidiendo la liberación de la molécula CLIP con lo cual interviene en el acoplamiento de los antígenos a los HLA Clase I.

El polimorfismo de las moléculas clase II se encuentra en las cadenas β de los antígenos HLA-DP, -DQ y –DR. Los residuos polimórficos están en cuatro cúmulos en los dominios β1 de DQ y DR, así como en un cúmulo de α1 de DQ. El polimorfismo de la cadena DPβ es limitado (Choo SY 1991).

Otros genes que se encuentran dentro de la clase II del SPH son los TAP y los LMP, cuya importancia radica en su participación durante el procesamiento y presentación antígenica mediados por clase I. Los genes del LMP son polimórficos y sus productos constituyen dos subunidades del complejo proteosomal a los cuales se les ha atribuido que

participan en la degradación de proteínas citosólicas y en la generación de peptidos antigénicos; mientras que las TAP (TAP1 y TAP2) forman un heterodímero y participan en el transporte de péptidos generados por las proteasas, desde el citosol hacia el retículo endoplásmico (Krensky AM 1997).

El polimorfismo alélico de los antígenos de clase I y II se reconoce fenotípicamente por serología y recientemente también por técnicas moleculares (Williams TM 2001).

II.3.3 Genes Clase III:

La región clase III contiene por lo menos 70 genes, con una densidad de aproximadamente un gen cada 10 kb en promedio.[23] Los genes de clase III del SPH, después del HLA, forman el conjunto de marcadores genéticos más polimórfico del humano.

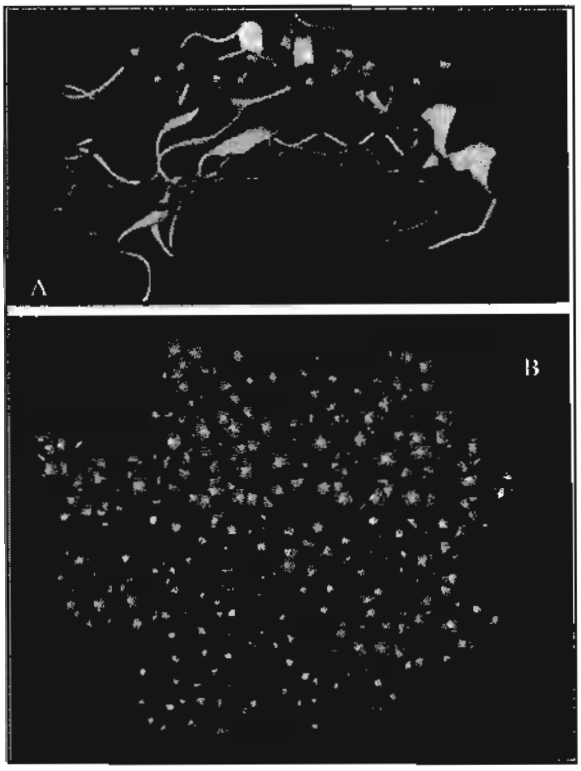


Figura 9. Molécula HLA Clase II. A) Vista lateral del dominio citoplásmico de unión al péptido. B) Vista superior. Péptido en rosa.

Los cuatro loci de esta región (C2, Factor B, C4A y C4B) se heredan en bloque. Las moléculas de C2 y del factor B son glicoproteínas de una sola cadena de 102,000 y 90,000 Daltones, respectivamente y circulan en el plasma en forma de pro-enzimas (Dausset J 1981).

La molécula de C4, pesa 200 Kd y tiene tres subunidades unidas por puentes disulfuro: α (95 Kd), β (75 Kd) y τ (30 Kd). Se sintetiza como una sola cadena en el orden β-α-τ que luego se glicosila y se procesa intracelularmente; secretándose como una estructura de tres cadenas. En los últimos años se ha estudiado el hecho de que muchos de los genes en la

región clase III codifican proteínas con funciones relacionadas con el sistema inmune como los genes del complemento, el factor B (fB), las proteínas de choque térmico (HSP) y el factor de necrosis tumoral (TNF) (Campbell RD and Trowsdale J, 1993).

II.3.4 Papel Fisiológico del Complejo:

Los antígenos de histocompatibilidad se descubrieron por su participación en el rechazo de injertos. La capacidad de distinguir lo propio de lo extraño es una característica de todos los organismos pluricelulares, apareciendo ya en los tunicados y los celenterados (pepinos de mar y estrellas de mar) como un mecanismo de mantener la identidad de la especie. Se va haciendo cada vez más sofisticado, hasta aparecer en los anfibios y probablemente ya en los peces. Es el mecanismo para destruir lo ajeno sin dañar lo propio y lo fundamental para eso es el gran polimorfismo de los sistemas genéticos los que permiten la alta variabilidad interindividual dentro de una misma especie, asegurando un sistema adecuado de unidades de reconocimiento sobre las células propias.

En la etapa de diferenciación intratímica, los linfocitos T (LT) aprenden a reconocer los antígenos extraños en el contexto de lo propio, según si van a ser CD4 (Clase II), o CD8 (Clase I). Ahí se produce la selección positiva, y el linfocito que no tiene la capacidad de reconocer I o II va a la apoptosis.

Los antígenos del SPH son indispensables para la inducción de la respuesta ya que el LT reconoce muy pobremente al antígeno que llega en forma soluble, y requiere del contexto de SPH en la membrana de la célula presentadora. Por eso, la expresión de sus antígenos regula en cierta forma la respuesta, ya que determina que va a ser reconocido y como. A nivel intracelular, los antigenos del SPH en la célula presentadora participan en el procesamiento del antígeno y son críticos en la presentación antigénica (Krensky AM 1997).

II.3.5 Procesamiento y Presentación de Antígenos:

Las células T sólo reconocen antígenos sobre la superficie de células accesorias en asociación a los productos de los genes del SPH propio. Los linfocitos T colaboradores $CD4^+$ reconocen antígenos asociados a los productos de los genes del SPH clase II (reconocimiento restringido por SPH clase II) y los linfocitos T citotóxicos (CTL) $CD8^+$ reconocen antígenos asociados a los productos de los genes del SPH clase I (reconocimiento restringido por SPH clase I).

El procesamiento del antígeno consiste en la introducción de los antígenos proteínicos en las células presentadoras de antígenos (APC), la degradación proteinolítica de estos compuestos en péptidos, la unión de los péptidos a las moléculas de SPH recién ensambladas y la exposición de los complejos péptido-SPH sobre la superficie de una APC para el reconocimiento potencial de células T. Las vías del procesamiento del antígeno en las APC utilizan los mecanismos celulares básicos de proteinólisis que también operan independientemente del sistema inmunitario. Tanto las proteínas extra como intracelulares son muestreadas a través de estas vías de procesamiento del antígeno, y los péptidos derivados de las proteínas normales propias y de las proteínas extrañas son expuestos por las moléculas del SPH para la vigilancia a través de los linfocitos T (Krensky AM 1997).

Las APC especializadas entre ellas macrófagos, linfocitos B y células dendríticas, internalizan las proteínas extracelulares en los endosomas para su procesamiento a través de la vía del SPH clase II. Estas proteínas sufren proteinólisis por enzimas que actúan a pH ácido en las vesículas de la vía endosómica. Los heterodímeros del SPH clase II recién sintetizados se asocian a la cadena invariable y son dirigidos desde el retículo endoplásmico (RE) hacia las vesículas endosómicas donde la cadena invariable sufre proteinólisis, eliminándose, a partir de la hendidura de unión del péptido en la molécula del SPH por la acción de moléculas DM, un pequeño péptido residual de la cadena invariable. Los péptidos generados a partir de

proteínas extracelulares se unen después a la molécula del SPH clase II, y el complejo trimérico (cadenas α y β del SPH clase II y el péptido) se traslada hacia la superficie de la célula.

Las proteínas citosólicas, que habitualmente se sintetizan en la célula, como las proteínas virales, siguen la vía del SPH clase I para la presentación del antígeno. El proteosoma es un complejo citoplasmático multiproteínico que degrada, mediante proteinólisis, las proteínas citoplasmáticas marcadas con ubicuitina y genera, probablemente, una gran cantidad de péptidos cuyo destino es unirse a las moléculas del SPH clase I. Los péptidos son distribuidos desde el citoplasma al RE a través de las moléculas transportadoras de antígenos (TAP). Los dímeros del SPH clase I recién formados en el RE se asocian y se unen a los péptidos distribuidos por TAP. La unión del péptido estabiliza las moléculas del SPH clase I y permite su movimiento desde el RE, a través de Golgi, hacia la superficie. Estas vías de presentación de antígeno restringidas por el SPH garantizan que sean escrutadas la mayor parte de las proteínas del organismo buscando la presencia de posibles antígenos extraños.

Las vías aseguran igualmente que las proteínas de los microorganismos extracelulares probablemente generen péptidos unidos a moléculas del SPH clase II para su reconocimiento con células T colaboradoras $CD4^+$, mientras que las proteínas codificadas por microorganismos intracelulares generan péptidos unidos a moléculas del SPH clase I para su reconocimiento por CTL $CD8^+$. La inmunogenicidad de las proteínas microbianas depende de la capacidad de las vías de procesamiento del antígeno para generar péptidos derivados de estas proteínas que se unen a moléculas del SPH propias (Abbas K et al. 1998).

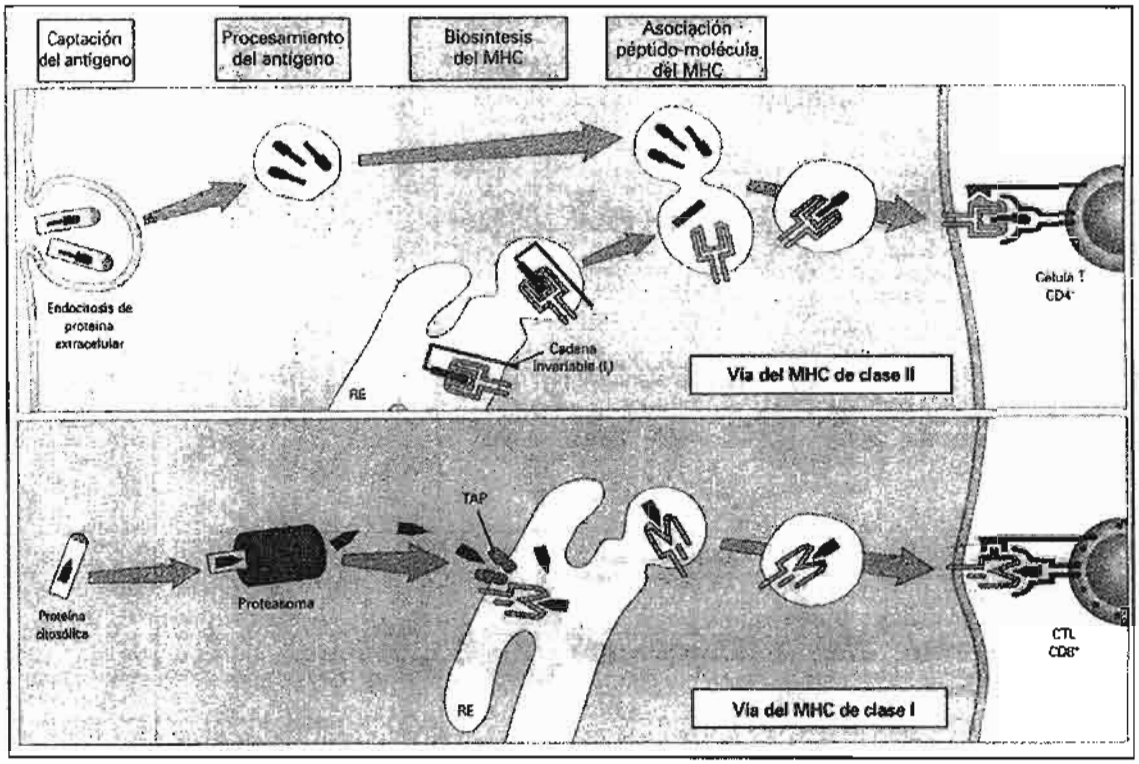


Figura 10. Vías de procesamiento y presentación de antígenos.

II.4 Marcadores HLA en la Enfermedad de Chagas:

Como ya se ha mencionado, un hecho que llama a atención en el desarrollo de ésta enfermedad, es que sólo un 30% de individuos infectados con *T. cruzi* desarrollen la fase crónica de la misma y que de éstos, algunos también desarrollen enfermedad cardiaca. Ésta evidencia ha sido utilizada para investigar y proponer que factores genéticos involucrados con la respuesta inmune del hospedero, pueden estar involucrados en el curso de la enfermedad. Así pues, se ha reportado un efecto protector del haplotipo HLA-DR14 DQB1*0301 en individuos peruanos asintomáticos (Nieto A et al. 2000). Otros alelos que han sido reportados como antígenos que confieren resistencia al desarrollo de la fase crónica y de la patología cardiaca, son el DQB1*06, reportado en población brasileña (Deghaide NH et al. 1998) y el DPB1*0101 en venezolanos (Colorado IA et al. 2000). Por otro lado, también se ha reportado el incremento de la frecuencia alélica entre pacientes infectados con éste parásito que

presentaron daño cardiaco e individuos asintomáticos, de tal manera que se reportó el HLA-C*03 como alelo de susceptibilidad al desarrollo de cardiomiopatia en población venezolana (Layrisse Z et al. 2000). Al respecto, DPB1*0401 combinado con DPB1*2301 o DPB1*3901, también en individuos chagásicos crónicos venezolanos, confiere susceptibilidad a la cardiomiopatía chagásica, mientras que la reducción en la frecuencia alélica de HLA-DPB1*0101 en el mismo grupo de pacientes, sugiere protección asociada con dicho alelo (Colorado IA et al. 2000). Por otro lado, un grupo brasileño mostró que no existe asociación entre genes HLA clase II (Dr y DQ) y la susceptibilidad al desarrollo de ésta enfermedad, aunque observaron que los varones tienen mayor riesgo de progresar al daño cardiaco severo que las mujeres (Fae KC et al. 2000). Como podemos apreciar, existen datos muy heterogéneos que obligan a hacer mayores esfuerzos en el estudio de la susceptibilidad genética al desarrollo de la infección y del daño cardiaco provocado en ésta parasitemia.

III. JUSTIFICACIÓN:

La Enfermedad de Chagas es conocida desde principios del siglo pasado y hasta éste tiempo no tiene cura. Es una importante parasitosis que ha sido considerada por la OMS como un problema de salud pública debido al número de casos anuales que surgen en todo nuestro continente y también a la gran dispersión que ha tenido debido a la transmisión que se da por transfusión sanguínea, reportándose casos de Chagas incluso en países europeos como Alemania. La patogénesis de ésta enfermedad es difícil de descifrar y se piensa que diversos factores pueden conjugarse para que la infección progrese hacia su fase crónica, en la cual el daño cardiaco es el más común, representativo y mortal. Un punto importante en ésta enfermedad es que, a pesar de que existe una gran población en riesgo de adquirir al parásito, sólo un 30% de los individuos infectados desarrollarán la fase crónica con síntomas característicos como la cardiomiopatía dilatada. Dentro de los factores que promueven su desarrollo, se han mencionado factores genéticos, tanto del parásito, como del hospedero que pueden predisponer o proteger al individuo a desarrollar la cronicidad. En éste ultimo punto, se sabe que el SPH y sus genes participan en la regulación de la respuesta inmune debido a que sus moléculas están involucradas en la presentación antigénica hacia los linfocitos que dictarán el tipo de respuesta inmune que desarrollará el hospedero ante una infección determinada y con ello, preparar al individuo para mantener la infección a niveles no dañinos o, por el contrario, promover su deterioro. Por otro lado, cabe señalar que la etnicidad encontrada en los diversos pueblos que habitan el continente americano presenta características diferentes en diferentes áreas geográficas, de aquí lo significativo de investigar y detectar marcadores inmunogenéticos de asociación entre ésta enfermedad y algún o algunos alelos HLA específicos.

IV. OBJETIVOS:

IV.1 Objetivo General:

Determinar la participación del polimorfismo de los genes del SPH (HLA clase I y II) y del promotor del Factor de Necrosis Tumoral alfa (TNF-α) en la susceptibilidad al desarrollo de la cardiopatía chagásica crónica en la población mexicana, así como si existe un perfil de citocinas asociado a la enfermedad.

IV.2 Objetivos Particulares:

- Cuantificar la expresión de citocinas circulantes, de tipo Th1 y Th2, y de sus receptores, en individuos infectados con *T. cruzi* (asintomáticos y crónicos) y en individuos sanos.
- Establecer el perfil molecular de antígenos HLA clase I y II en individuos infectados con *Trypanosoma cruzi* y en individuos sanos.
- Detectar si existen diferencias entre las frecuencias alélicas de los loci HLA clase I y II de los individuos infectados con *Trypanosoma cruzi* y los individuos sanos.
- Analizar las frecuencias alélicas de los loci HLA clase I y II de los individuos asintomáticos, con cardiopatía chagásica, e individuos sanos.
- Detectar si existen diferencias entre las frecuencias alélicas y génicas de los promotores del gen TNF-α -238 y TNF-α -308, entre individuos infectados con *Trypanosoma cruzi* e individuos sanos.
- Detectar si existen diferencias entre las frecuencias alélicas y génicas de los promotores del gen TNF-α -238 y TNF-α -308, entre individuos infectados con *Trypanosoma cruzi* asintomáticos, con Cardiopatía Chagásica Crónica e individuos sanos.

V. MATERIAL Y MÉTODOS:

V.1 Diseño del estudio:

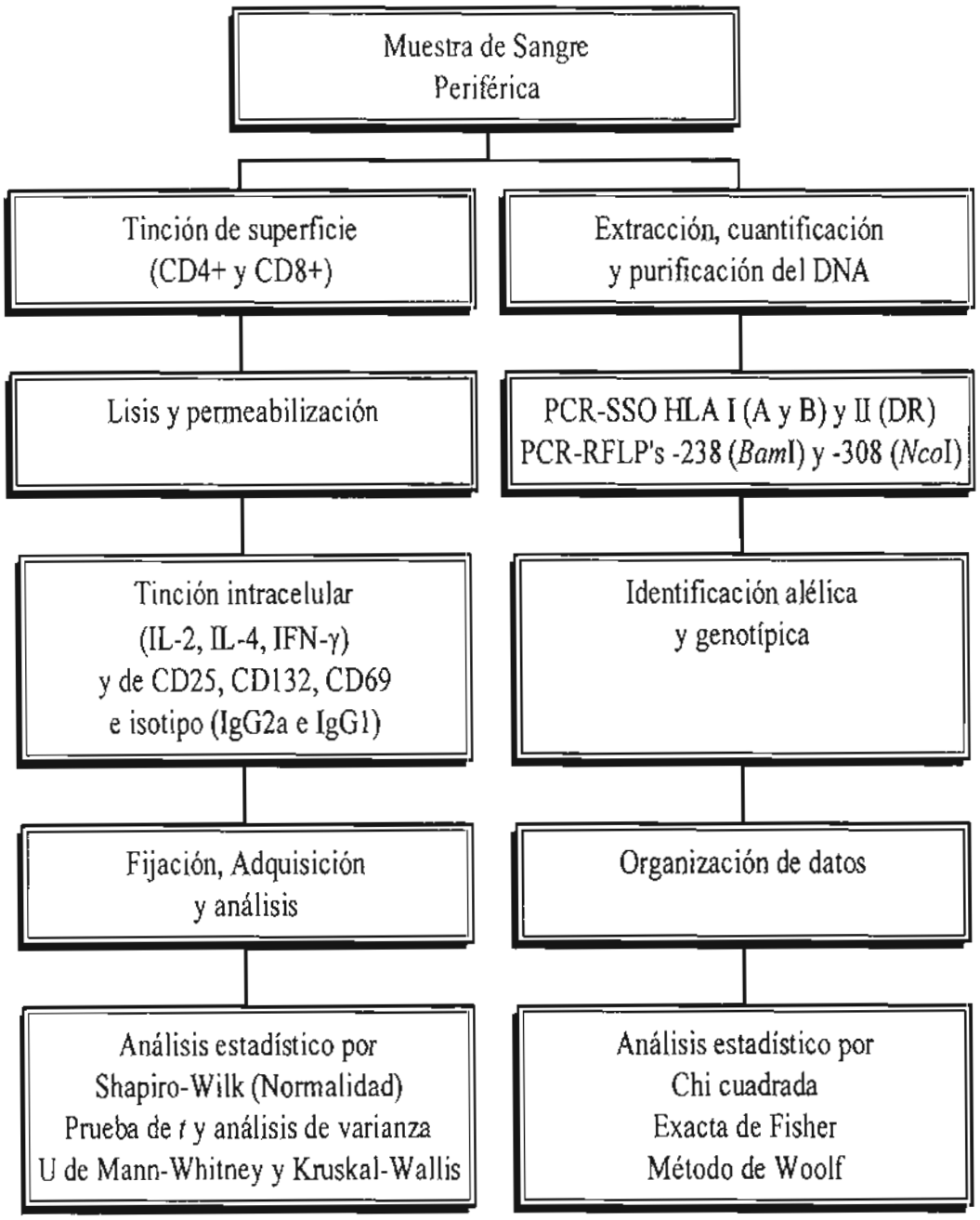
Se trata de un estudio transversal, analítico de casos y controles.

V.2 Estrategia general:

- Se captaron individuos infectados con *Tripanosoma cruzi* y pacientes diagnosticados clínicamente y por estudios de laboratorio y gabinete con Enfermedad de Chagas, en el Instituto Nacional de Cardiología, "Ignacio Chávez". Así mismo, se captaron individuos sanos sin serología positiva para *T. cruzi* como controles.
- Se procedió a la obtención de una muestra sanguínea de cada individuo. Se separó una alícuota de sangre total de cada muestra para el análisis de citocinas y el resto se usó para la extracción de DNA de células blancas por medio del método de extracción fenólica (Miller y cols., 1988). Se determinó la pureza del DNA por espectrofotometría.
- Las muestras sanguíneas se marcaron con anticuerpos de superficie (CD4, CD8, CD25 y CD132, CD69, IgG1, IgG2a) y anticuerpos intracelulares (IL-2, IL-4 e IFN-γ) específicos, conjugados con diferentes fluorocromos, para observar el estado inmunológico de cada individuo por medio de citofluorometría (Denticina SS et al. 1995).
- Una vez teñidas las diferentes células T con los anticuerpos monoclonales arriba mencionados, se fijaron las células y se adquirieron en un citómetro de flujo (Excalibur FACScan de Becton Dickinson) para su posterior análisis estadístico.
- El DNA de cada individuo sirvió como molde para amplificar los exones dos y tres de los genes HLA-A y HLA-B, el exón dos del gen HLA-DR, y las regiones polimórficas de los promotores -238 y -308 del gen TNF-α; por medio de la técnica de reacción en cadena de la polimeraza (PCR) (Mullis, 1990).

- Los productos de PCR de los genes HLA clase I y II, se hibridaron con oligonucleótidos secuencia específica (PCR-SSO) por dot-blot inverso (Kit Amplicor; Hoffman La Roche, Basel, Switzerland) y las regiones polimórficas de los promotores -238 y -308 del gen TNF-α, se analizaron por medio de la técnica de Fragmentos de restricción polimórfica (RFLP's) con las enzimas *Bam*I y *Nco*HI respectivamente (Wilson AG et al. 1992, Skoog T et al.1999).
- Para asegurar la homogeneidad étnica de los individuos analizados, se realizó la tipificación de alta resolución de los alelos HLA-DR4 por medio de PCR-SSO (Reed E et al. 1992).
- Se obtuvieron los porcentajes de linfocitos T marcados con los diferentes anticuerpos, su promedio, desviación estándar y mediana, y se analizaron por medio de la prueba estadística de Shapiro-Wilk para comprobar la distribución normal de las muestras. Se utilizó la prueba de *t* y el análisis de varianza para aquellos datos con distribución normal y U de Mann-Whitney y Kruskal-Wallis para los datos no distribuidos como una normal, todos ellos con significancia ≤ 0.05.
- Se calcularon las frecuencias alélicas y génicas para los genes HLA y TNF-α observadas en todos los grupos y se analizaron por medio de la prueba de Chi cuadrada (X^2) o exacta de Fisher. El riesgo relativo se calculó como Razón de Momios por el método e Woolf (Woolf B, 1955).

Estrategia general



V.3 Estudio clínico:

En el presente trabajo se incluyeron 66 individuos mexicanos, no relacionados entre sí, con diagnóstico clínico de Enfermedad de Chagas y anticuerpos circulantes anti *T. cruzi*, diagnosticados en el Instituto Nacional de Cardiología, "Ignacio Chávez", demostrados al menos por dos pruebas serológicas concordantes (IFI y ELISA). Éstos individuos se clasificaron de acuerdo a sus características clínicas, ecocardiográficas y electrocardiográficas (ECG) en asintomáticos y con Cardiopatía Chagásica crónica (CCC). La población asintomática (51.5%) se caracterizó por ser individuos aparentemente sanos con ECG normal y sin presentar cardiomegalia. Los pacientes con CCC (48.5%) presentaron arritmias ventriculares, cinco o más extrasístoles por minuto, episodios embólicos, cardiomegalia o falla cardiaca congestiva. Como grupo control se incluyó a una población de 127 individuos aparentemente sanos, no relacionados entre si, que compartieran las mismas características medioambientales y socioeconómicas que los infectados y sin enfermedad cardiaca ni serología positiva anti- *T. cruzi*.

V.3.1 Criterios de Inclusión:

- Pacientes y controles, así como sus dos últimas generaciones, que hayan nacido en México.
- Que tengan entre 18 y 50 años de edad.
- Infectados deberán tener anticuerpos anti-*T. cruzi* circulantes (IFI/ELISA concordantes).
- Infectados con CCC (Crónicos) diagnosticados clínicamente por presentar arritmias, cinco o más extrasístoles ventriculares por minuto, episodios embólicos, cardiomegalia o falla cardiaca congestiva.

- Controles sanos sin antecedentes de enfermedad cardiaca ni anticuerpos anti-*T. cruzi*; con similares características medioambientales y socioeconómicas que los pacientes.
- Firmar carta de consentimiento para participar en éste estudio.

V.3.2 Criterios de Eliminación:

- Pacientes en los cuales se presente alguna falla técnica durante el proceso de estudio que provoque pérdida irrecuperable de la muestra o del DNA.

V.3.3 Criterios de Exclusión:

- Individuos con infecciones de origen no chagásico, transfundidos en los últimos tres meses o que se encuentren bajo tratamiento médico que pueda interferir en este estudio.
- No ser mexicano.
- Infectados con anticuerpos anti-*T. cruzi* sólo con una prueba serológica positiva.
- Controles sanos con alguna anomalía cardiaca.
- No estar de acuerdo en participar en el estudio.

V.4 Citometría de Flujo:

V.4.1 Colecta y Preparación de la muestra:

Se obtuvieron 2 ml. de sangre venosa de 32 individuos seropositivos a *T. cruzi*.(17 asintomáticos y 15 crónicos) y 10 individuos sanos, en tubos estériles con EDTA como anticoagulante. Las muestras se almacenaron a temperatura ambiente (TA) y se tiñeron dentro de las dos horas siguientes a su obtención. Se utilizaron 800 microlitros (µl) de cada muestra,

depositando alícuotas de 100 µl, con un número aproximado de 3.5 a 9.8 X 10^3 leucocitos/ µl, en 8 diferentes tubos Falcón de 12 X 75 mm. que fueron marcados del 1 al 8.

V.4.2 Tinción de superficie:

De los tubos anteriores, cuatro se incubaron con 10 µl de anticuerpos monoclonales (MABs) anti CD4 humano (1 al 4) y cuatro con anti CD8 humano (5 al 8), ambos conjugados con PerCP (Becton Dickinson, Erembodegem, Belgium), durante 15 minutos, a TA y en oscuridad. Posteriormente, se agregaron a cada tubo 2 ml de solución de lisis 1X FACS (Becton Dickinson, Erembodegem, Belgium), se agitaron y se incubaron por 10 min. en oscuridad a TA. Inmediatamente después, los tubos se centrifugaron a TA, a 500 g por 5 min. Se decantó el sobrenadante y el paquete celular se resuspendió con 500 µl de solución de permeabilización 1X FACS (Becton Dickinson, Erembodegem, Belgium).

V.4.3 Tinción intracelular:

Las muestras se incubaron con solución de permeabilización 1X FACS durante 10 minutos a TA y en la oscuridad. Posteriormente, a cada tubo se le agregó 1 ml. de solución de lavado (Amortiguador de fosfatos salino (PBS) 10 mM, pH= 7.4; albúmina sérica bovina (BSA) al 0.5% y azida de sodio (NaN_3) al 0.1%), se agitaron levemente y se centrifugaron a TA por 5 min. a 500g. Se decantó el sobrenadante y se resuspendió el paquete celular con el resto de solución que quedó en cada tubo. Enseguida se agregaron 5 µl de los siguientes anticuerpos monoclonales anti humano marcados con diferentes fluoróforos: IL-2-FITC (Isotiocianato de fluoresceína, tubos 1 y 5), IL-4-FITC (tubos 2 y 6), IFN-γ-FITC (tubos 3 y 7), IgG2a-FITC (tubos 4 y 8), CD25-PE (Ficoeritrina, tubos 1 y 5), CD132-PE (tubos 2 y 6), CD69-PE (tubos 3 y 7) e IgG1-PE (tubos 4 y 8). Los tubos se incubaron a temperatura TA por 30 min. y en oscuridad. Finalmente, a todos los tubos se les agregaron 1.5 ml. de solución de

lavado, se agitaron levemente y se entrifugaron a 500 g por 10 min. a 4°C. Se decantó el sobrenadante y las células así teñidas se fijaron con 500 µl de paraformaldehído al 1% en PBS y se almacenaron en oscuridad a 4°C.

V.4.4 Adquisición y análisis:

Se utilizó un citómetro de flujo modelo FACScan (Becton Dickinson, Immunocytometry System, San José CA, EUA) equipado con un láser de argón (488 nm), el cual fue preparado para el análisis de las muestras, para lo cual se emplearon perlas de calibración (Becton Dickinson) y el software AutoCOMP. De ésta forma, se verificó el ajuste de los detectores, se comprobó la discriminación adecuada entre las tres fluorescencias empleadas y se comprobó la sensibilidad del equipo.

La adquisición de los datos se realizó empleando el software LYSYS II. En ensayos previos con marcaje de células T totales (CD3-PerCP) se determinó la pureza de la región analizada y el porcentaje de recuperación. Para lo anterior , se realizó el análisis de la dispersión frontal (FSC) y de la dispersión lateral de la luz (SSC), que están relacionadas con el tamaño y la complejidad interna de las células. Con éste ejercicio, pudimos ubicar las regiones específicas de las subpoblaciones CD4 y CD8 de los linfocitos T que analizamos.

Los resultado fueron analizados en gráficas de puntos, en las cuales se pueden observar diferentes cuadrantes que corresponden a las diferentes combinaciones de anticuerpos empleados en el marcaje de las células. Se presentan los porcentajes de células positivas para cada caso. Para cada individuo se identificó el porcentaje de células positivas y dobles positivas y se calculó el promedio, la desviación estándar y la mediana para analizar los grupos estadísticamente. En cada muestra se verificó que la pureza de la región de linfocitos, así como el porcentaje de recuperación de los mismos fuera mayor del 90% y que se analizaran un mínimo de 2000 linfocitos en todas las muestras.

V.5 Estudio Molecular:

V.5.1 Extracción y purificación de DNA *(Miller y cols, 1988):*

Se colectó una muestra de 10 a 15 ml. de sangre periférica de 66 individuos seropositivos a *T. cruzi* (34 asintomáticos y 32 crónicos) y 127 individuos sanos, en tubos Vacutainer con EDTA al 5% como anticoagulante. Las muestras se centrifugaron a 3,000 r.p.m. durante 20 min. Se tomó la capa de linfocitos y se pasó a un tubo de ensayo. Los linfocitos extraídos se lavaron por agitación vigorosa con 5 ml de amortiguador para lisis de células rojas (RCLB), el cual contiene: Tris-HCl 10mM pH 7.6, $MgCl_2$ 5mM y NaCl 10 mM; la mezcla anterior se centrifugó a 3000 rpm/10 min., se decantó el sobrenadante y el botón se lavó nuevamente en la misma forma. Posteriormente, se realizó la hidrólisis de linfocitos por incubación a 42°C por 12 horas con 1.5 ml de amortiguador para lisis de células blancas (WCLB), que contiene: Tris-HCl 10 mM pH 7.6, EDTA 10mM pH 8.0, NaCl 50 mM, SDS 0.2% y proteinasa K 200 mg/ml. El DNA se purificó lavando el hidrolizado dos veces por medio de agitación-centrifugación con 3 ml de Fenol saturado pH 7.6, un lavado con 3 ml de Fenol-Cloroformo (v/v) y dos lavados con 3 ml de Cloroformo-alcohol isoamílico (24:1 v/v), siempre recuperando el sobrenadante para lavarlo con el siguiente reactivo. Finalmente, el DNA se precipitó con una solución de Cloruro de sodio 60 mM en Etanol absoluto a -20°C. El DNA se recuperó con un asa de vidrio y se enjuagó con etanol al 70%. Posteriormente se dejó secando hasta la evaporación total del etanol y se resuspendió en 200 μl de agua bidestilada estéril. Por último se cuantificó por espectrofotometría a una longitud de onda (λ) de 260 nm. Se cuantificó la concentración de impurezas como fenol y proteínas a una λ de 240 y 280 nm respectivamente. Se consideró como criterio de pureza el cociente DO_{260}/DO_{240} y DO_{260}/DO_{280} mayor o igual a 1.6, y menor de 2.0. La concentración de DNA en μg/μl se obtuvo multiplicando el valor de DO_{260} por 0.05 (constante) y por la dilución empleada (1:200):

Concentración de DNA (μg/μl) = (DO_{260})(dilución)(50 μg de DNA);

en donde 50 μg de DNA= 1 DO_{260}

Se verificó la integridad del DNA extraído en un gel de agarosa al 0.7% teñido con bromuro de etidio (5 mg/ml). La electroforesis se corrió a 100 volts por 20 minutos y se observó en un transiluminador con luz ultravioleta.

V.5.2 Tipificación de los genes HLA clase I y II:

La reacción en cadena de la polimerasa (PCR) permite la amplificación, en forma exponencial, de un fragmento de DNA manejando una serie de temperaturas en forma cíclica para desnaturalizar, alinear y extender un fragmento específico de DNA.

V.5.2.1 Amplificación por Reacción en cadena de la Polimerasa:

El DNA de cada individuo se utilizó como molde para la amplificación de los exones polimórficos 2 y 3 de los genes HLA-A (314 y 480 pares de bases (pb) respectivamente) y HLA-B (355 y 376 pb), y el exón 2 (272 pb) del gen HLA-DR, por medio de la PCR, utilizando oligonucleótidos biotinilados y deoxinucleótidos trifofatos (dNTP's) con el uso de deoxiuridina en lugar de deoxitimidina, provistos en un equipo comercial (DYNAL RELI™ SSO Amplicor; Hoffman La Roche, Basel, Switzerland). La mezcla de reacción fue la siguiente:

Reactivo	*Volumen*	*[Stock]*	*[Final]*
H_2O	8.00 µl		
Master Mix	10.00 µl	10 X	1 X
Taq Polimeraza	0.25 µl	5 U/µl	1.25 U
$MgCl_2$	7.5 µl	30 mM	1.5 mM
DNA	1.0 µl	200 ng/µl	200 ng

Los reactivos se mezclaron siempre en el mismo orden.

- Se colocó el DNA de cada paciente en un tubo de reacción y después se le adicionó la mezcla de reacción.
- Dicha mezcla se homogeneizó suavemente por agitación y se colocó en un termociclador (Thermal Cycler 9700 de Perkin Elmer) con el siguiente programa:

Proceso	*Temperatura*	*Tiempo*	*Ciclos*
Desnaturalización	94°C	2 min.	1
Desnaturalización	94°C	20 seg.	
Alineación	60°C	40 seg.	35
Extensión	72°C	20 seg.	
Desnaturalización	94°C	15 seg.	
Alineación	55°C	20 seg.	1
Extensión	72°C	1 min.	
Incubación	4°C	Permanente.	

Una vez que concluyó la amplificación, se tomaron 7μl del amplificado y se mezclaron con 3μl de colorante acarreador (Rojo de Cresol o Azul de Bromofenol) para verificar el producto amplificado por electroforesis en gel de agarosa al 2.5 %, con un corrimiento a 100 volts por 15 min. El gel se tiñó con 1μl de Bromuro de Etidio (5mg/ml), y se observó en un transiluminador (con luz UV). Se utilizó 1μg del marcador de pesos moleculares DNA Leader 100 pb (Boheringer Manheimhein) para cotejar el amplificado.

V.5.2.2 Tipificación por Dot-blot inverso:

Para tipificar los alelos HLA amplificados por PCR, se utilizaron oligonucleótidos de secuencia específica (SSO) para los diferentes alelos de cada gen, adheridos a una membrana de nylon en forma de tiras delgadas. Los productos de PCR obtenidos (amplicones) se mezclaron con 25 μl de solución de desnaturalización (EDTA al 3%, NaOH al 1.6% y azul de

Timol) y se incubaron por 10 min. a TA. Las tiras con los SSO a hibridar, se marcaron en uno de sus extremos para identificarlas y se colocaron en recipientes adecuados para su procesamiento. Posteriormente se les agregaron 2 ml. de amortiguador de hibridación precalentado a 51°C (PBS, EDTA al 1% y ProClin 150) junto con el amplificado ya desnaturalizado, y se colocaron en estufa de incubación a 50°C por 30 min. con agitación constante, para promover la hibridación entre los amplicones y los SSO. Enseguida, se decantó la solución de hibridación y el resto del amplificado y se hizo un lavado rápido con 2 ml. de amortiguador de lavado (PBS, SDS concentrado) a TA y un lavado más prolongado con 2 ml. de amortiguador de lavado a 51°C por 15 min. y agitación constante. Después de obtener las tiras con los SSO hibridados con los productos de PCR, se decantó la solución de lavado y se procedió a revelar las sondas por medio de un conjugado estreptoavidina-peroxidasa. Las tiras se colocaron en recipientes adecuados y se les agregó el conjugado (1.1 ml. de solución de lavado a temperatura ambiente + 3.3 µl del conjugado estreptoavidina-HRP), con el cual se incubaron durante 15 min. con agitación constante y a TA. Se realizaron dos lavados más de 5 min. cada uno con solución de lavado a TA y agitación constante y un lavado final con amortiguador de citratos (Citrato de sodio 10 mM ph= 7.4 y H_2O_2 al 0.01%) por 5 min. a TA. Finalmente, se decantó el sobrenadante y las tiras se revelaron con 1 ml. del sustrato 3,3',5,5'- Tetrametilbenzidina (TMB) al 0.1% y dimetilformamida al 40%, ambas en amortiguador de citratos, con agitación constante y durante 3 min. o hasta obtener la intensidad del color deseado. Una vez reveladas las tiras, la reacción se detuvo decantando el sobrenadante y lavando exhaustivamente las tiras con agua bidestilada.

La tipificación de alelos en cada paciente se realizó por el patrón de lectura observado en las líneas azules que se observaron sobre cada una de las tiras que contienen los SSO hibridados con el producto el PCR específico para cada gen que se amplificó. Las líneas azules se leyeron con una mascarilla especial proporcionada por la casa comercial, y el patrón

de lectura se determinó con un software especial diseñado por la misma compañia comercial (F Hoffman La Roche Ltd, and Roche Molecular Systems, Inc.).

V.5.3 Análisis por RFLP's del promotor de TNF-α:

Para el análisis de las regiones promotoras -238 y -308 del gen TNF-α, se incluyeron 54 individuos Mexicanos infectados con *T. cruzi* (27 asintomáticos y 27 crónicos) y 169 individuos sanos como controles.

V.5.3.1 Amplificación por Reacción en cadena de la Polimerasa:

La PCR se realizó utilizando oligonucleótidos modificados (iniciador *forward:* 5'-AAACAGACCACAGACCTGGTC-3' e iniciador *reverse:* 5'-CTCACACTCCCCATCCTCCCGGATC-3'), que incluyen dos sitios de restricción (bases subrayadas) para la enzima *Bam*HI (Skoog T et al. 1999). El polimorfismo de TNF-308 T1/T2 se analizó con los iniciadores *forward* 5'-GAGGCAATAGGTTTTGAGGGCCAT-3' y *reverse* 5'-GGGACACACAAGCATCAAG-3', con un sitio de restricción para la enzima *Nco*I (Wilson AG et al. 1992). La mezcla de reacción fue la siguiente:

Reactivo	***Volumen***	***[Stock]***	***[Final]***
H_2O	10.5 µl		
Amortiguador taq	2.5 µl	10 X	1 X
dNTPs	4.0 µl	1.25 mM	1 mM
Oligonucleótido F	2.5 µl	5 pmol/µl	12 pmol
Oligonucleótido R	2.5 µl	5 pmol/µl	12 pmol
Taq Polimerasa/Stoffel	0.175 µl	10 U/µl	1.75 U
$MgCl_2$	2.0 µl	25 mM	2 mM
DNA	1.0 µl	100 ng/µl	100 ng

Los reactivos se mezclaron siempre en el mismo orden.

- Se colocó el DNA de cada paciente en un tubo de reacción y después se le adicionó la mezcla de reacción.
- Dicha mezcla se homogeneizó suavemente por agitación y se colocó en un termociclador (Thermal Cycler 9700 de Perkin Elmer) con el siguiente programa:

Proceso	*Temperatura*	*Tiempo*	*Ciclos*
Desnaturalización	94°C	2 min.	1
Desnaturalización	94°C	20 seg.	
Alineación	60°C	40 seg.	35
Extensión	72°C	20 seg.	
Extensión	72°C	5 min.	1
Incubación	4°C	Permanente.	

V.5.3.2 Análisis con endonucleasas de restricción:

Este tipo análisis se llevó a cabo en los productos de PCR de cada individuo con las enzimas *Bam*HI y *Nco*I, con el fin de observar la segregación de los diferentes alelos y genotipos de cada individuo, de acuerdo a su patrón electroforético. La reacción de digestión se llevó a cabo en tubos de reacción con la siguiente mezcla:

Reactivo	**Concentración**
Producto de PCR	1 μg
Enzima	5 U
Amortiguador de la enzima	1X
H_2O	Aforar a 50 μl

La mezcla de restricción se incubó de 2 a 12 horas a 37°C. Posteriormente, se tomaron 20 µl del producto restringido para analizarlos en electroforesis de poliacrilamida al 9% teñido con plata.

V.6 Análisis de Resultados:

Los datos obtenidos en las muestras analizadas por citometría de flujo fueron recopilados y se les aplicó la prueba de Shapiro-Wilk para saber si se distribuyen o no como una Normal. Aquellos datos que presentaron una distribución normal, se analizaron con la prueba de *t* para dos grupos (infectados y sanos) o por análisis de varianza cuando se compararon tres grupos (CCC, asintomáticos y sanos). Los datos no distribuidos como una Normal, se analizaron con la U de Mann-Whitney para dos grupos y con la prueba de Kruskal-Wallis para tres grupos. En todas estas pruebas estadísticas se tomó en cuenta un valor de $p \leq 0.05$ para decidir la significancia de los datos comparados.

Las frecuencias alélicas y genotípicas de los genes HLA y TNF-α analizados se obtuvieron por conteo directo. En cada grupo de estudio se evaluó el equilibrio de Hardy-Weinberg por medio de la prueba de chi-cuadrada (X^2). Las diferencias entre grupos se determinaron usando la prueba de X^2 de Mantel-Haenzel, la cual combina tablas de contingencia de 2x2 usando el programa estadístico EPIINFO (V. 5.0; USD Incorporated 1990, Stone Mountain, GA, USA). Cuando el número comparado en alguna celda fue menor a 5, se utilizó la prueba Exacta de Fisher. El valor de *p* se corrigió (pC) multiplicando su valor por el número de comparaciones realizadas en cada locus, con nivel de significancia establecido como pC<0.05. El riesgo relativo con intervalo de confianza del 95% (IC) se evaluó como razón de momios (RM) utilizando el método de Woolf.

ACERVO HISTÓRICO
DOCUMENTACIÓN Y SERVICIOS DE INFORMACIÓN

VI. RESULTADOS:

VI.1 Estudio Clínico:

Se captaron 66 individuos con anticuerpos circulantes anti-*T. cruzi*, demostrados por ensayo inmunoenzimático en fase sólida (ELISA) y por la prueba de inmunofluorescencia indirecta (IFI). Dichos individuos fueron captados en el Banco de Sangre, la consulta externa y el servicio de hospitalización del Instituto Nacional de Cardiología, "Ignacio Chávez". El 46.9% fueron del sexo femenino y el 53.1% fueron varones. De ellos, el 51.5% no presentaron sintomatología y, al ser entrevistados, proporcionaron datos como habitar o haber habitado en zonas endémicas de la enfermedad, conocer al vector transmisor (Chinche besucona) y recordar haber estado en contacto con éste insecto. La edad promedio de estos individuos fue de 41 $\pm$ 3 años. Los restantes 34 pacientes (48.5%) presentaron ECG anormal, caracterizado principalmente por bloqueo parcial o completo de la rama derecha, taquicardia y extrasístoles ventriculares y cardiomegalia grado I o II. La edad promedio de estos pacientes fue de 60 $\pm$ 5 años. El grupo de comparación consistió en individuos aparentemente sanos, quienes no mostraron signos de enfermedad cardiaca ni anticuerpos circulantes contra el parásito. Fueron elegidos al azar, en el Banco de sangre, tomando en cuenta su origen y residencia, de tal suerte que compartieran semejantes características medioambientales y socioeconómicas que los individuos infectados. El 59% fueron mujeres con edad promedio de 35 $\pm$ 6 años y el 41% fueron hombres con edad promedio de 38 $\pm$ 6 años. El número de individuos analizados con las diferentes técnicas tuvo variaciones que tuvieron que ver con la calidad del material analizado, en la mayoría de los casos, y con la disponibilidad de los productos en otros casos. Para cada análisis se muestran los valores de *n* analizados.

VI.2 Perfil de Citocinas:

El estado inmune de los individuos infectados con *T. cruzi* (asintomáticos y crónicos) y de los controles, se observó midiendo el porcentaje de células positivas a diferentes anticuerpos. Así pues, se analizaron 32 individuos infectados, de los cuales 17 fueron asintomáticos y 15 presentaban CCC. Se escogió una muestra de 10 individuos sanos como grupo de comparación negativo. Se marcaron linfocitos T cooperadores ($CD4^+$) y T citotóxicos ($CD8^+$) y en cada uno de ellos se midieron citocinas tipo Th1, como la interleucina 2 y el Interferón gama (IL-2, IFN-γ) y de tipo Th2 (IL-4), además de sus receptores CD25 para IL-2 y CD132 para IL4, y un marcador de activación temprana (CD69). Como control interno de isotipo, se usaron MABs anti IGg2a e IgG1 de ratón. La figura 11 muestra un panel de gráficas en las que se puede apreciar la región de células $CD4^+$ o $CD8^+$ que se analizaron y los cuadrantes analizados que dan idea de las marcas positivas o dobles positivas para las diferentes fluorescencias detectadas. La tabla 2 muestra los porcentajes de células positivas y dobles positivas, con distribución normal, detectados en los individuos infectados comparados con el grupo control en células CD4+ y CD8+. En éste análisis se puede observar que los individuos infectados presentan un incremento significativo de células tanto CD4+ como CD8+ con mayor expresión del receptor para IL-2, CD25 ($p < 0.05$ en ambos casos). Por otro lado, podemos observar también un aumento significativo de células positivas para CD132/IL4 en células CD8+ de individuos infectados comparados con el grupo de individuos sanos ($p = 0.031$). Los datos de subpoblaciones linfocitarias que no se distribuyeron como una normal, se analizan en la tabla 3, en donde podemos observar las percentiles a 25%, 50% y 75% para diferentes marcadores (IL-2, IL-4, IFN-γ y CD69) en células CD4+ y CD8+. En este análisis detectamos una disminución significativa de la producción de citocinas (IL-2, IL-4 e IFN-γ) en ambas subpoblaciones celulares (CD4+, CD8+) y un aumento significativo de células activadas, denotado por el marcador CD69, también en ambas poblaciones (CD4+,

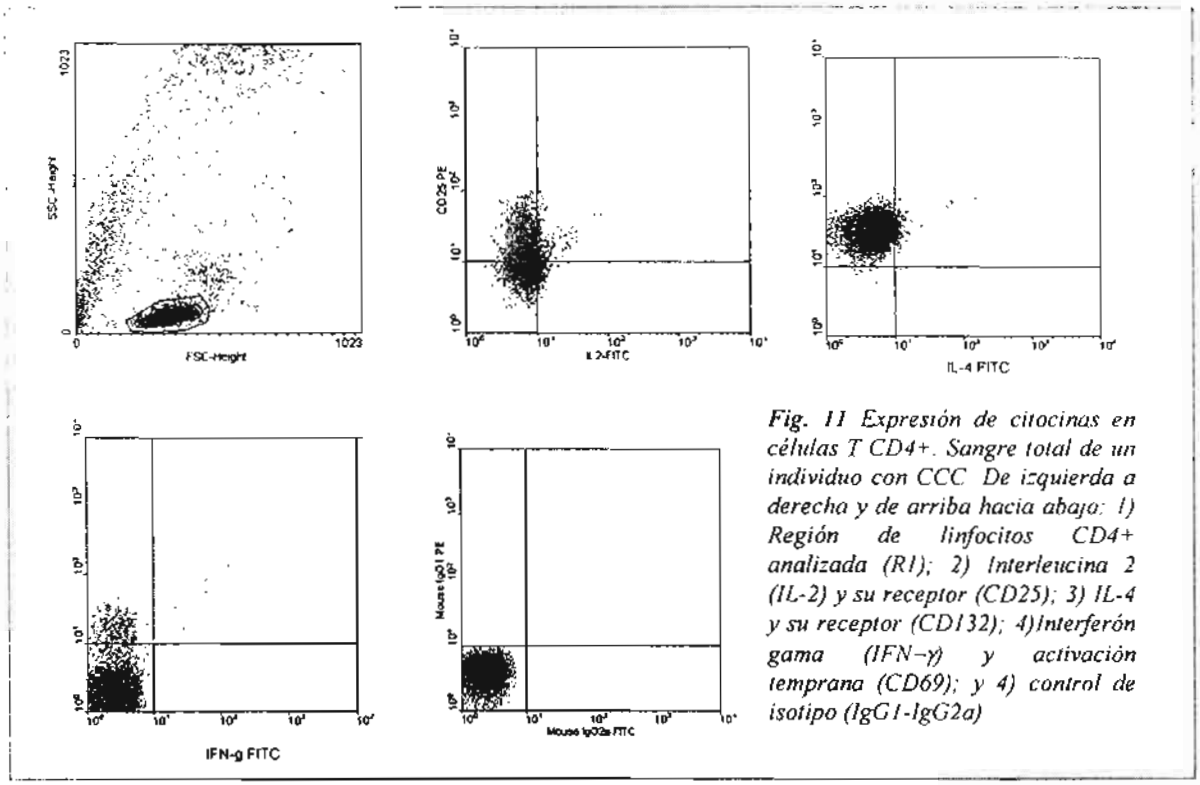


Fig. 11 Expresión de citocinas en células T CD4+. Sangre total de un individuo con CCC. De izquierda a derecha y de arriba hacia abajo: 1) Región de linfocitos CD4+ analizada (R1); 2) Interleucina 2 (IL-2) y su receptor (CD25); 3) IL-4 y su receptor (CD132); 4)Interferón gama (IFN-γ) y activación temprana (CD69); y 4) control de isotipo (IgG1-IgG2a)

CD8+), todo ello en individuo infectados comparados contra valores obtenidos en individuos sanos (p = 0.0002 en ambos casos). Cuando dividimos a los individuos infectados en asintomáticos y con CCC y los comparamos entre ellos y contra el grupo de individuos sanos, observamos los porcentajes vertidos en las tablas 4 y 5 para células CD4+ y CD8+ distribuidos y no distribuidos como una normal, respectivamente. En la tabla 4 observamos un considerable aumento en la expresión de CD25, tanto en células CD4+ como en CD8+, tanto en individuos asintomáticos como con CCC, comparados con los individuos sanos (p = 0.001 y p = 0.0001, respectivamente). Al igual que cuando se compararon los individuos infectados contra los sanos, podemos observar en la tabla 5 una disminución de la expresión de las citocinas IL-2, IL4 e IFN-γ tanto en las células CD4+ como en las CD8+, de individuos asintomáticos como con CCC, comparados con el grupo de individuos sanos con valores de p muy significativos. De la misma forma, se observa un aumento de células CD4+ o CD8+

activadas en individuos asintomáticos o crónicos comparados contra el grupo de individuos sanos ($p = 0.0002$ y $p = 0.0008$ respectivamente).

Tabla 2. Porcentaje de células $CD4^+$ y $CD8^+$ de individuos infectados con *T. cruzi* e individuos sanos, marcadas con diferentes anticuerpos (Media ± Desviación estándar).

CD4+	**Infectados** (n = 32)	**Sanos** (n = 10)	p
Anticuerpo			
CD25	29.27 ± 13.57	5.05 ± 3.45	< 0.05
CD132	35.85 ± 22.75	32.97 ±15.05	
CD8+			
CD25	14.60 ± 10.80	0.62 ± 0.36	< 0.05
CD132	26.35 ± 19.28	27.63 ± 12.06	
CD132/IL-4	17.24 ± 17.89	8.50 ± 7.33	0.031

Datos distribuidos como una normal. Prueba de *t* para dos grupos con $p \leq 0.05$.

Tabla 3. Células CD4+ y CD8+ de individuos infectados con *T. cruzi* (1) e individuos sanos (2), marcadas con diferentes anticuerpos. Se muestran sólo los datos relevantes.

CD4+

Anti-	Grupos	25%	Mediana	75%	p
IL-2	1	0.04	0.075	0.215	
	2	0.61	0.755	1.45	0.0007
IL-4	1	0.02	0.065	0.205	
	2	0.58	1.075	1.65	0.0036
IFN-γ	1	0.07	0.185	0.55	
	2	0.36	0.565	1.91	0.0147
CD69	1	0.06	0.19	3.87	
	2	0.02	0.025	0.04	0.0002

CD8+

Anti-	Grupos	25%	Mediana	75%	p
IL-2	1	0.03	0.085	0.385	
	2	0.34	0.53	1.58	0.0085
IL-4	1	0.00	0.02	0.63	
	2	0.31	0.8	1.20	0.0028
IFN-γ	1	0.045	0.125	0.375	
	2	0.29	0.52	0.98	0.0097
CD69	1	0.145	0.57	7.6	
	2	0.01	0.04	0.06	0.0002

Datos no distribuidos como una Normal. U de Mann-Whitney con $p \leq 0.05$.

Tabla 4. Células CD4+ y CD8+ de individuos asintomáticos, pacientes con CCC e individuos sanos, marcados con diferentes anticuerpos (Media ± Desviación estándar).

CD4+	Asintomáticos (n = 17)	Con CCC (n = 15)	Sanos (n = 10)
Anti-			
CD25	30.50 ± 12.79	27.88 ± 14.73	5.05 ± 3.45[a]
CD132	37.10 ± 23.84	34.42 ± 22.20	32.97 ± 15.05
CD8+			
CD25	16.66 ± 11.16	12.26 ± 10.24	0.62 ± 0.36[b]
CD132	24.78 ± 16.86	28.13 ± 22.19	27.63 ± 12.06
CD132/IL-4	22.27 ± 18.67	11.54 ± 15.63	8.5 ± 7.33

[a] Disminuido comparado contra asintomáticos y crónicos ($p = 0.001$).
[b] Disminuido comparado contra asintomáticos y crónicos ($p = 0.000$).
Datos distribuidos como una normal. Análisis de varianza para tres grupos con $p \leq 0.05$.

VI.3 Perfil de Antígenos HLA Clase I y II:

La figura 12 muestra un gel de agarosa al 2.5% en el cual se pueden apreciar los productos de PCR obtenidos al amplificar el exón 2 (314pb) y 3 (480 pb) del gen HLA-A. Se analizaron, en primera instancia, a los individuos asintomáticos y con CCC englobados en un solo grupo como individuos infectados y se compararon sus frecuencias génicas contra las obtenidas en el grupo de individuos sanos (control). La tabla 6 muestra las frecuencias alélicas de los individuos infectados y del grupo control. El análisis estadístico de ellos, reveló un incremento de la frecuencia de los alelos HLA-B39 (pC= 4.3 X 10^{-5}, RM= 3.35) y DR4 (pC= 1.8 X 10^{-5}, RM= 2.91) en los individuos infectados comparados contra los sanos. El análisis de los subtipos DR4 indicó que los alelos más frecuentes, tanto en los infectados como en el grupo control, fueron DR*0407, *0403 y *0411. Estos subtipos tuvieron una distribución relativa muy semejante en ambos grupos, con lo cual podemos observar que ambos grupos comparten un similar trasfondo genético.

Tabla 5. Células CD4+ y CD8+ de individuos asintomáticos (1), pacientes con CCC (2) e individuos sanos (3), marcados con diferentes anticuerpos. Se expresan los datos relevantes.

CD4+

Anti-	Grupos	25%	Mediana	75%	p
IL-2	1	0.04	0.07	0.12	
	2	0.03	0.1	0.67	
	3	0.61	0.755	1.45	0.0021
IL-4	1	0.01	0.05	0.18	
	2	0.06	0.11	0.23	
	3	0.58	1.075	1.65	0.009
IFN-γ	1	0.07	0.100	0.23	
	2	0.12	0.42	0.90	
	3	0.36	0.565	1.91	0.0153
CD69	1	0.12	0.21	17.16	
	2	0.03	0.10	0.67	
	3	0.02	0.025	0.04	0.0002

CD8+

Anti-	Grupos	25%	Mediana	75%	p
IL-2	1	0.03	0.085	0.24	
	2	0.03	0.22	0.69	
	3	0.34	0.53	1.58	0.028
IL-4	1	0.00	0.02	0.13	
	2	0.00	0.02	0.76	
	3	0.31	0.8	1.20	0.0109
IFN-γ	1	0.04	0.09	0.15	
	2	0.05	0.21	0.47	
	3	0.29	0.52	0.98	0.0161
CD69	1	0.17	0.58	13.95	
	2	0.12	0.56	2.44	
	3	0.01	0.04	0.06	0.0008

Datos no distribuidos como una Normal. Prueba de Kruskal-Wallis para tres grupos con $p \leq 0.05$.

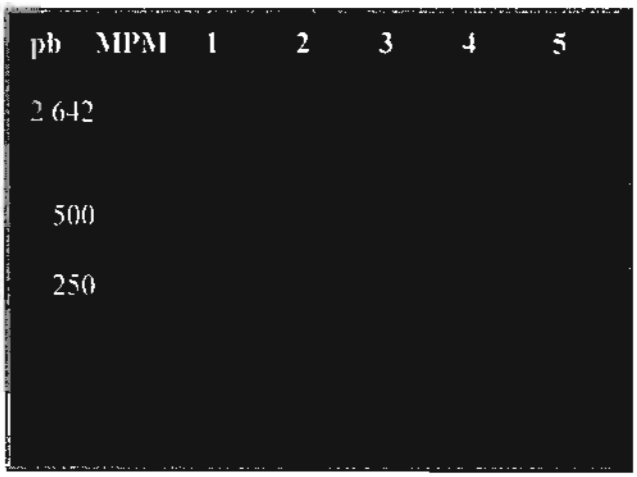


Fig. 12 PCR de los exones 2 (314pb) y 3 (480pb) del gen HLA-A. Bromuro de Etidio. MPM= Marcador de pesos moleculares ϕX138-HaeIII.

Para investigar el efecto de los genes del sistema principal de histocompatibilidad en la susceptibilidad genética para desarrollar la fase crónica de la enfermedad, se analizó la distribución de los antígenos HLA clase I y II en los grupos por separado. Es decir, asintomáticos, con CCC y sanos. El análisis estadístico indicó un incremento significativo en la frecuencia del alelo HLA-A68 en los asintomáticos comparados con el grupo CCC (pC= 0.014; RM= 4.99) y contra el grupo control (pC= 0.014; RM= 2.94), como se observa en la tabla 7. Las frecuencias alélicas del HLA-B se pueden observar en la tabla 8. Como podemos darnos cuenta, el grupo de pacientes con CCC presenta un incremento en la frecuencia del HLA-B35 cuando se compara con el control (pC= 0.048; RM= 2.56), pero no cuando se compara contra los asintomáticos. Por otro lado, la frecuencia del HLA-B39 presenta un incremento significativo en los individuos asintomáticos cuando se comparó contra el grupo CCC (pC= 0.001; RM= 4.46) y contra el grupo control (pC < $1x10^{-5}$; RM= 7.62). En cuanto a los alelos HLA de clase II, se puede apreciar el amplificado del exón 2 (272 pb) del gen HLA-DR en la figura 13 y en la figura 14 se muestra el patrón de hibridación, por dot reverso, en algunas tiras de diferentes pacientes analizados para el gen

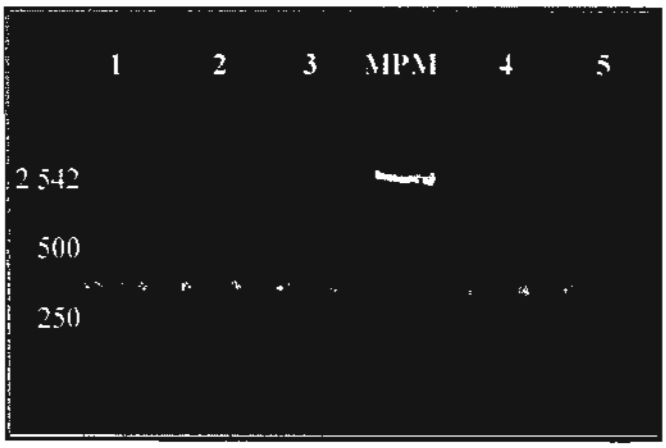


Fig. 13 PCR del exón 2 (272pb) del gen HLA-DR. Bromuro de Etidio. MPM= Marcador de pesos moleculares HaeIII.

DR. Por otro lado, en la tabla 9 (página 66), podemos observar un incremento significativo de la frecuencia del HLA-DR4 en individuos asintomáticos cuando se comparan con el grupo control (pC= 2 x 10^{-5}; RM= 3.7). El grupo de pacientes con CCC también presentó una frecuencia elevada del HLA-DR4 al compararlo con los individuos sanos (pC= 0.05, RM= 2.26). Otro alelo cuya frecuencia se observó elevada al compararlo tanto con los asintomáticos como con el grupo control, fue el HLA-DR16 de pacientes con CCC (pC= 0.05; RM= No determinado y pC= 0.02; RM= 5).

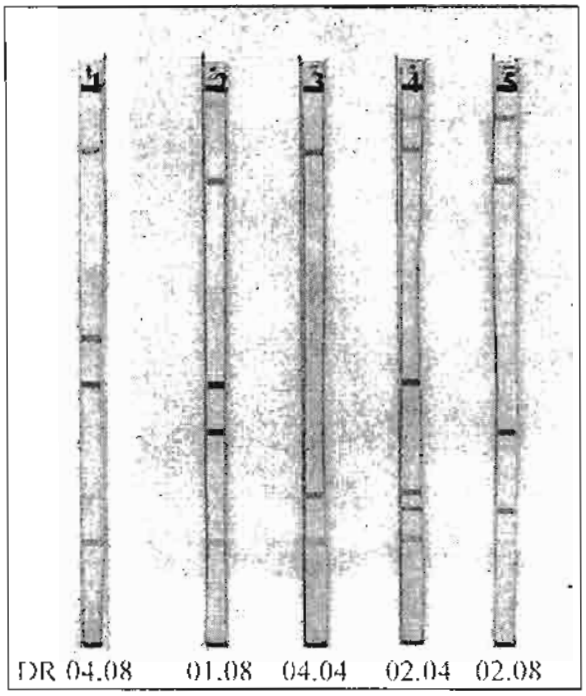


Fig. 14. Dot-Blot Reverse para HLA-DR

Tabla 6. Frecuencias génicas (fg) de los alelos HLA-A, -B y -DR en individuos infectados con T. cruzi y controles sanos.

	Individuos Infectados (n= 64)		Controles Sanos (n= 127)			
Alelo	**n**	**fg**	**n**	**fg**	**pC**	**RM**
A 2	50	0.396	76	0.299	NS	1.50
A 3	1	0.007	17	0.066	NS	0.11
	(n= 63)		(n= 127)			
B14	2	0.015	14	0.55	NS	0.28
B35	30	0.238	36	0.141	NS	1.89
B39	46	0.365	33	0.129	4.3×10^{-5}	3.35
B48	4	0.031	2	0.007	NS	4.13
B51	2	0.015	17	0.066	NS	0.22
B52	8	0.063	7	0.027	NS	2.39
	(n= 66)		(n= 127)			
DR 4	64	0.484	62	0.244	1.8×10^{-5}	2.91
DR 7	3	0.022	26	0.102	NS	0.20
DR15	1	0.007	18	0.070	NS	0.10

Solo se presentan los alelos relevantes.

pC= p corregida, NS= no significativo, RM= Razón de momios.

Tabla 7. Frecuencias génicas (fg) del gen HLA-A en individuos infectados con T. cruzi (asintomáticos y con cardiomiopatía) y controles. Se muestran solo los alelos relevantes.

	Individuos				Controles	
	Asintomáticos (n=31)		CCC (n=33)		(n=127)	
HLA	n	fg	n	fg	n	fg
A1	2	0.032	2	0.030	18	0.070
A2	22	0.354	29	0.439	76	0.299
A3	0	0.000	1	0.015	17	0.066
A11	1	0.016	0	0.000	10	0.039
A24	13	0.209	13	0.196	43	0.169
A29	2	0.032	0	0.000	11	0.043
A31	2	0.032	9	0.136	14	0.055
A68	16	0.290[a]	5	0.075	31	0.122

[a] Incrementado al compararlo con el grupo CCC (pC= 0.022, RM= 4.99) y contra el control (pC= 0.014, RM= 2.94).

pC= p corregida, RM= Razón de momios.

VI.4 Polimorfismo del promotor del TNF-α:

La figura 15 muestra el análisis por RFLP's del promotor −308 del gen TNF-α en varios individuos, en donde se pueden apreciar los sitios de corte y no corte para la enzima *Nco*HI. En la misma figura podemos apreciar el genotipo homocigoto para el corte (T1/T1) o para el no corte (T2/T2) y el heterocigoto (T1/T2) en los individuos ahí analizados. La tabla 10 muestra las frecuencias alélicas y genotípicas del polimorfismo del promotor de TNF-α (posiciones -238 y -308) observadas en el grupo total de pacientes infectados con *T. cruzi* y controles sanos. Se observó que ambos grupos se encuentran en equilibrio de Hardy-Weinberg. El grupo de pacientes infectados mostró incremento de la frecuencia del alelo -308 T2 (A) al compararlo con el grupo control (pC= 0.008, RM= 3.03, IC 95%= 1.29-7.12). Por

otro lado, se observó disminuida la frecuencia del alelo -308 T1 (G) al comparar contra el grupo de individuos sanos (pC= 0.008, RM= 0.33, IC95%= 0.14-0.78).

Tabla 8. *Frecuencias génicas (fg) del gen HLA-B en individuos infectados con T. cruzi (asintomáticos y con cardiomiopatía) y controles. Se muestran solo los alelos relevantes*

	Individuos				Controles	
	Asintomáticos (n=31)		CCC (n=32)		(n=127)	
HLA	**n**	**fg**	**n**	**fg**	**n**	**fg**
B7	0	0.000	2	0.031	13	0.051
B14	0	0.000	2	0.031	14	0.055
B15	3	0.048	5	0.078	13	0.051
B35	11	0.177	19	0.296[a]	36	0.141
B39	33	0.532[b]	13	0.203	33	0.129
B40	4	0.064	9	0.140	21	0.082
B44	1	0.016	3	0.046	21	0.082
B48	2	0.032	2	0.031	2	0.007
B51	1	0.016	1	0.015	17	0.066
B52	2	0.032	6	0.093	7	0.027

[a] Incrementada al compararla con el grupo control (pC= 0.048, RM= 2.56).

[b] Incrementada en contra del grupo CCC (pC= 0.001, OR= 4.46) y en contra del control (pC< $1x10^{-5}$, RM= 7.62).

pC= p corregida, NS= no significativo, RM= Razón de momios.

Para establecer la participación del polimorfismo del promotor de TNF-α en el desarrollo de la CCC, se analizaron las frecuencias génicas y alélicas por separado, tanto en el grupo de pacientes con CCC como en los asintomáticos y en los individuos sanos (Tabla 11). El análisis estadístico mostró incremento de la frecuencia alélica -308 T2 (A) y genotípica -308 T1T2 (AG) en el grupo de pacientes con CCC cuando se compararon con los

asintomáticos (pC= 0.0002, RM= No definida y pC= 0.003, RM= No definida, respectivamente); y también al compararlos contra los controles (pC= $4x10^{-7}$, RM= 7.02, IC95% = 2.87-17.22 y pC = 0.0006, RM = 5.29, IC95% = 1.8-15.46). Todos los pacientes

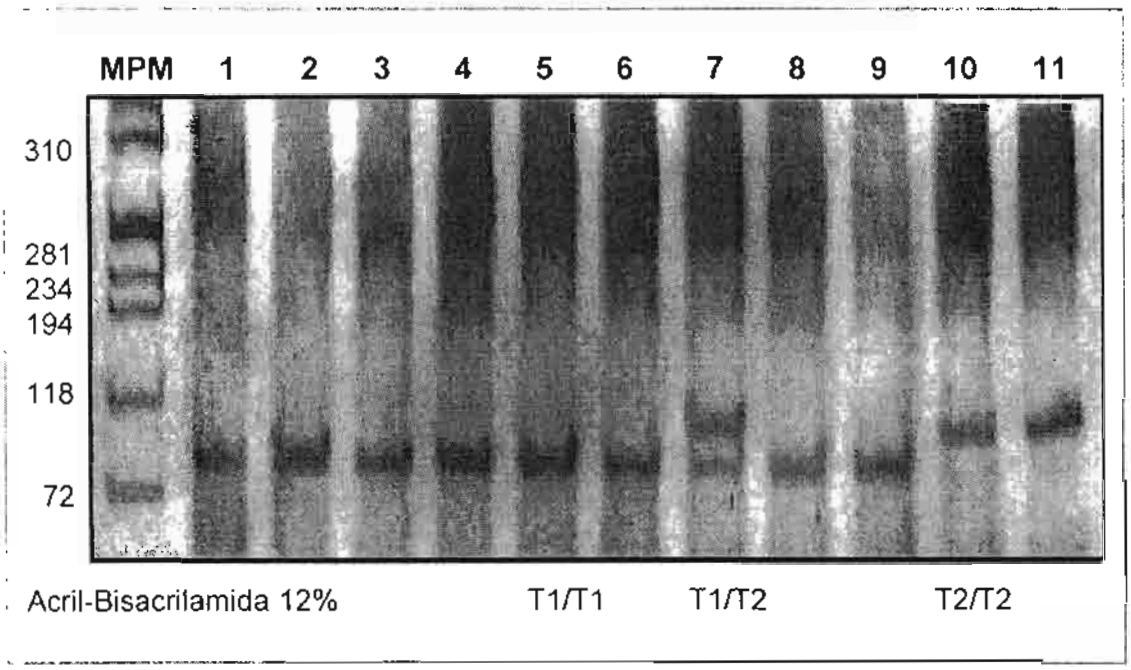


Figura 15 RFLP's para la región promotora -308 del TNF-α. Los carriles 1 al 5, 6 y 7, muestran el sitio de corte para la enzima BamI. Los carriles 10 y 11 muestran el no corte para la enzima y el carril 7 muestra un genotipo heterocigoto para este polimorfismo. El producto de PCR es de 107 pb y la enzima corta 20 pb.

positivos para el alelo T2 (A), presentaron cardiopatía chagásica crónica. Por otro lado, se observó disminución de la frecuencia alélica -308 T1 (G) en los pacientes crónicos comparados con el grupo de asintomáticos (pC= 0.0002, RM= No definida) y con los individuos sanos (pC= $4x10^{-7}$, RM= 0.14, IC95%= 0.06-0.35). Así mismo, los pacientes con CCC mostraron incremento de la frecuencia genotípica -308 T2T2 (AA) al ser comparada con el grupo control (pC= 0.012, RM= No definida) y disminución de la frecuencia genotípica T1T1 (GG) comparada con los individuos asintomáticos (pC= 0.0006, RM= No definida).

Tabla 9. Frecuencias génicas (fg) del gen HLA-DR en individuos infectados con T. cruzi (asintomáticos y con cardiomiopatía) y controles. Se muestran solo los alelos relevantes.

	Individuos				Controles	
	Asintomáticos (n=34)		CCC (n=32)		(n=127)	
HLA	n	fg	n	fg	n	fg
DR1	1	0.014	2	0.031	15	0.059
DR3	7	0.102	0	0.000	11	0.043
DR4	37	0.544[a]	27	0.421[b]	62	0.244
DR7	2	0.029	1	0.015	26	0.102
DR8	7	0.102	13	0.203	41	0.161
DR13	4	0.058	2	0.031	11	0.043
DR14	5	0.073	12	0.187	29	0.114
DR15	1	0.014	0	0.000	18	0.070
DR16	0	0.000	7	0.109[c]	6	0.023

[a] Incrementado al compararlo contra los controles (pC= 2×10^{-5}, RM= 3.7).

[b] Incrementado al compararlo contra los controles (pC= 0.05, RM= 2.26).

[c] Incrementado comparado contra asintomáticos (pC=0.05, RM= No determinedo), y contra controles (pC= 0.02, RM= 5.0).

pC= p corregida, NS= no significativo, RM= Razón de momios.

Tabla 10. Frecuencias alélicas (fa) y genotípicas (fg) del polimorfismo del promotor de TNF-α (posiciones -238 y -308) en pacientes infectados con T. cruzi y en individuos sanos (control).

	Pacientes (n= 53)		**Controles** (n= 169)				
TNFα-238							
Alelos	**n**	**fa**	**n**	**fa**	**pC**	**RM**	**IC95%**
A	5	0.047	23	0.068	----	----	-----
G	101	0.952	315	0.932	----	----	-----
Genotipos	n	fg	n	fg			
GG	48	0.906	147	0.869	----	----	-----
AG	5	0.094	21	0.124	----	----	-----
AA	0	0.000	1	0.006	----	----	-----
TNFα-308	(n= 54)		(n= 162)				
Alelos	**n**	**fa**	**n**	**fa**	**pC**	**OR**	**IC95%**
T1	95	0.880	310	0.956	0.008	0.33	0.14-0.78
T2	13	0.120	14	0.043	0.008	3.03	1.29-7.12
Genotipos	**n**	**fg**	**n**	**fg**			
T1T1	43	0.796	148	0.913	----	----	-----
T1T2	9	0.166	14	0.086	----	----	-----
T2T2	2	0.037	0	0.000	----	----	-----

pC= *p* corregida. RM= Razón de Momios. IC= Intervalo de Confianza.

Tabla 11. Frecuencias alélicas (fa) y genotípicas (fg) del polimorfismo del promotor de TNF-α (posiciones -238 y –308) en pacientes con Cardiopatía Chagásica Crónica (CCC), individuos asintomáticos y en individuos sanos (control).

	Pacientes con CCC (n= 26)		Asintomáticos (n= 27)		Control (n= 169)	
TNFα-238						
Alelos	**n**	**fa**	**n**	**fa**	**n**	**fa**
A	4	0.077	1	0.018	23	0.068
G	48	0.923	53	0.981	315	0.932
Genotipos	**n**	**fg**	**n**	**fg**	**n**	**fg**
GG	22	0.846	26	0.963	147	0.869
AG	4	0.154	1	0.037	21	0.124
AA	0	0.000	0	0.000	1	0.006
TNFα-308	(n= 27)		(n= 27)		(n= 162)	
Alelos	**n**	**fa**	**n**	**fa**	**n**	**fa**
T1	41	0.759[a]	54	1.0	310	0.956
T2	13	0.240[b]	0	0.0	14	0.043
Genotipos	**n**	**fg**	**n**	**fg**	**n**	**fg**
T1T1	16	0.592[c]	27	1.0	148	0.913
T1T2	9	0.333[d]	0	0.0	14	0.086
T2T2	2	0.074[e]	0	0.0	0	0.000

[a] Disminuido al comparar con los individuos asintomáticos (pC= 0.0002, RM= No definida) y contra el grupo control (pC= 4 x 10^{-7}, RM= 0.14, IC95%= 0.06-0.35).
[b] Incrementado al comparar con los individuos asintomáticos (pC= 0.0002, RM= No definida) y contra el grupo control (pC= 4 x 10^{-7}, RM= 7.02, IC95%= 2.87-17.22).
[c] Disminuido al comparar con los individuos asintomáticos (pC= 0.0006, RM= No definida).
[d] Incrementado al comparar con los individuos asintomáticos (pC= 0.003, RM= No definida) y contra el grupo control (pC= 0.0006, RM= 5.29, IC95%= 1.8-15.46).
[e] Incrementado al comparar con el grupo control (pC= 0.012, RM= No definida).

VII. DISCUSIÓN:

La enfermedad de Chagas se conoce desde principios del siglo pasado (Chagas, 1909) y aún no se ha encontrado cura para éste mal. Es una de las principales infecciones parasitarias endémicas de América y la OMS ha calculado que existen más de 20 millones de personas en riesgo de adquirirla. Por otro lado, el hecho de que algunos individuos que habitan en zonas endémicas sean resistentes a adquirir la infección y que, de los infectados, sólo un pequeño número desarrollen la fase crónica de la enfermedad, nos puede hacer pensar que existen factores genéticos que pueden estar actuando para conferir resistencia o susceptibilidad al desarrollo de ésta enfermedad. Como ya se ha apuntado, existen diferentes hipótesis que tratan de explicar los mecanismos de daño dentro de la patogenia de ésta enfermedad. El daño mecánico que causa el parásito al anidarse en células, sobre todo de tejido muscular en general, puede provocar desinervación de tejidos que causen una disfunción del órgano involucrado, además del daño que las mismas células experimentan al romperse para que el parásito pueda liberarse y seguir infectando a otras células, formando así ciclos de infección y destrucción que poco a poco y, a lo largo del tiempo, van provocando el deterioro crónico de los órganos afectados. Otras hipótesis han involucrado mecanismos autoinmunes en el desarrollo de la enfermedad de Chagas. Aprovechando la oportunidad de medir citocinas en individuos asintomáticos y crónicos que asistieron al Instituto Nacional de Cardiología, "Ignacio Chávez", y observando que la gran mayoría de información que se tiene al respecto del patrón de citocinas que despliega un organismo ante las diferentes fases, sobre todo la aguda, de ésta enfermedad; en éste trabajo quisimos observar el estado inmunológico basal que presentaban los individuos arriba mencionados, al momento de llegar a su consulta periódica o al hacer una donación

en el Banco de sangre del propio instituto y mostrar anticuerpos circulantes anti- *T. cruzi*. Las muestras sanguíneas de los individuos analizados aquí, fueron marcadas con los diferentes anticuerpos sin tratamiento previo alguno, es decir, sin estimular a las células con algún compuesto que provoque la expresión de diversas citocinas. En este sentido, nuestras observaciones, de acuerdo a los resultados ya mostrados, fueron que los individuos infectados con el parásito, sean asintomáticos o crónicos, presentan un mayor número de células T (CD4+ o CD8+) activadas que los individuos sanos. Por otro lado, éstos individuos presentan también una mayor cantidad de receptores para IL2, que de las mismas citocinas y tal vez se expresen en menor proporción en células CD8+ que en las CD4+. Se sabe que existen diversos mecanismos que controlan la discriminación de lo propio y lo no propio, los cuales incluyen la deleción tímica de células T autoreactivas y la inducción de anergia en la periferia. Además de estos mecanismos pasivos, se ha ido acumulando evidencia que apoya la supresión activa de autoreactividad por una población de células T supresoras o reguladoras que coexpresan CD4 y CD25 (cadena α del receptor de IL-2). Las células T $CD4^+$ $CD25^+$ son potentes inhibidoras de la activación de células T tanto *in vivo* como *in vitro*. Aunque el concepto de supresión mediada por células T se propuso hace más de 30 años, recientes estudios en modelos animales de autoinmunidad han retomado el interés en la existencia de un subgrupo de linfocitos que suprimen específicamente la respuesta inmune (Shevach EM, 2000). Las células T $CD4^+$ $CD25^+$ representan una de las subpoblaciones bien caracterizadas de células T reguladoras y previenen el desarrollo de enfermedades autoinmunes que aparecen después de tres días de timoctomía, la transferencia de enfermedad mediada por clonas de células T autoreactivas o enfermedades inducidas por poblaciones de células T CD4+ que son repletadas de células T

reguladoras (como $CD4^+$ $CD25^-$, o subgrupos $CD4^+$ $CD45RB^{high}$) (Sakaguchi S 2000). Además, una deficiencia parcial de células T $CD4^+$ $CD25^+$ puede contribuir a la susceptibilidad genética de autoinmunidad como se observa en los ratones NOD, los cuales desarrollan diabetes mellitas insulina dependiente en forma espontánea (Salomón B et al, 2000). Las células T $CD4^+$ $CD25^+$ suprimen la proliferación de células T $CD4^+$ $CD25^-$ o CD8+ y la producción de citocinas, como IL-2 e IFN-γ, *in vitro* (Thornton AM and Shevach EM, 1998; Piccirillo CA and Shavach EM, 2001). En el presente estudio, pudimos corroborar estas observaciones debido a que encontramos disminución de éstas citocinas, además de IL-4, en todos los individuos infectados (ya sean asintomáticos o crónicos) comparados con individuos sanos. Los mecanismos por los cuales estas células reguladoras median sus efectos supresores no están bien esclarecidos; sin embargo, en muchos estudios se ha observado que la supresión que generan es dependiente del contacto celular más que por citocinas como IL-4 o IL-10. Finalmente, en este estudio por citometría de flujo, no pudimos observar una polarización de la respuesta inmune en los individuos analizados y tampoco se observó una gran diferencia en la expresión de citocinas y receptores entre individuos asintomáticos y pacientes con CCC.

Por otro lado, el reconocimiento de lo "propio" y lo "extraño" por medio de diversas moléculas como las expresadas por los genes del Sistema Mayor de Histocompatibilidad, ha provocado el estudio de éstos genes polimórficos como marcadores de susceptibilidad genética en este tipo de enfermedades con un mecanismo autoinmune involucrado en su desarrollo. Así pues, en éste trabajo analizamos los genes del SPH clase I (HLA-A y -B) y clase II (HLA-DR) en un grupo de individuos seropositivos a *T. cruzi* con y sin cardiomiopatía y un grupo de individuos sanos como control. El grupo total de individuos

infectados mostró incremento en las frecuencias de HLA-B39 y HLA-DR4 cuando se compararon con el grupo control, lo cual puede sugerir que estos antígenos pueden estar relacionados con la susceptibilidad a la infección por *T. cruzi*. Por otro lado, se ha observado que estos dos antígenos se encuentran comúnmente reportados en diversas poblaciones sanas de América. En nuestro país, existen reportes en población Tarasca e indígena y Mestiza en donde éstos alelos presentan frecuencias génicas elevadas (De Leo C et al. 1997, Vargas-Alarcón G et al. 2000, Loeza F et al. 2002) con lo cual se podría inferir el alto riesgo de nuestra población nacional en adquirir ésta infección. Un estudio en población mestiza de Perú informó el efecto protector del haplotipo HLA-DR14 DQB1*0301 en la infección por *T. cruzi*; sin embargo, en este estudio no se encontró asociación con el desarrollo de la miocardiopatía chagásica crónica (Nieto A et al. 2000). Existen otros estudios en donde se ha encontrado asociación entre ésta enfermedad y alelos HLA tanto de clase I como de clase II; sin embargo, no existe un consenso general y los datos son muy heterogéneos (Deghaide NH et al. 1998). Así mismo, se han realizado investigaciones en otras poblaciones como la Venezolana, en donde se encontró al alelo HLA-Cw3 y al haplotipo DRB1*01-DQB1*0501 sobre expresados en un grupo de pacientes chagásicos con cardiomiopatía (Colorado IA et al. 2000, Layrisse Z et al. 2000). Por otro lado, se encontró disminución de la frecuencia génica del haplotipo HLA-B40-Cw3 en chagásicos Chilenos con cardiomiopatía en comparación con chagásicos sin cardiomiopatía (Llop E et al. 1988). En este trabajo, las comparaciones entre las frecuencias génicas de los individuos asintomáticos y crónicos mostraron importantes diferencias. Los alelos HLA-A68 y HLA-B39 se encontraron significativamente incrementados en los individuos asintomáticos comparándolas con los crónicos y contra el grupo control. Este hallazgo es muy importante debido, por un lado, a que ambos antígenos son muy frecuentes

en las poblaciones americanas, lo cual puede implicar un papel importante en el control de la enfermedad en áreas endémicas del continente Americano. Por otro lado, recordemos que los genes clase I del SPH producen las moléculas que van a unir péptidos para presentarlos a linfocitos T citotóxicos ($CD8^+$), los cuales están muy implicados en el control inmunológico de patógenos extracelulares. De igual forma, el hecho de que el HLA-DR4 se haya encontrado incrementado en ambos grupos de individuos infectados (asintomáticos y crónicos), corrobora su participación como antígeno de susceptibilidad genética a padecer la infección por *T. cruzi*. Por otro lado, el incremento de la frecuencia de HLA-DR16 en pacientes crónicos, cuando se compararon con individuos sanos y asintomáticos, sugiere que este antígeno puede estar asociado con la susceptibilidad a desarrollar daño cardiaco en estos pacientes. Además, el HLA-DR16 se ha encontrado asociado con otras enfermedades autoinmunes en las cuales el agente infeccioso juega un papel muy importante (Weidebach W et al. 1994, White AG et al. 1997, Dubaniewicz A, 2000, Hernández-Pacheco G et al. 2003). Al igual que el antígeno anterior, el HLA-B35 puede tener un efecto parecido, pues éste se encontró incrementado en los pacientes crónicos en comparación con los individuos sanos, pero no al compararlo con los asintomáticos. En un estudio realizado en mestizos de Guatemala, se encontró una frecuencia génica significativamente elevada en 33 individuos con CCC comparados con 138 controles seronegativos a *T. cruzi* ($pC < 0.003$, RM= 5.5),además, se analizó el polimorfismo del promotor del Factor de necrosis tumoral alfa y del gen MICA en esta misma población y no se encontró asociación entre éstos y la enfermedad. Un dato curioso fue el hecho de encontrar un mayor riesgo de desarrollo de la cardiopatía en individuos que presentaron una combinación de alelos HLA-B35 y MICA-A5 , que cuando estos alelos se encontraban de forma individual en los pacientes analizados (Aida K et al. 2000). Esta observación podría sugerir que existe sinergismo de ambos alelos

para permitir el desarrollo de la cardiopatía chagásica crónica y nos sugiere el análisis del polimorfismo del gen MICA en nuestra población.

Los mecanismos por los cuales los genes HLA pueden estar determinando la susceptibilidad al desarrollo de la enfermedad de Chagas aún no están bien definidos y son difíciles de explicar. Los genes del SPH regulan la respuesta inmune en contra de las infecciones, unen péptido y presentan antígenos a las células T, teniendo un importante papel en la activación de las células T y en su maduración hacia un tipo de respuesta Th1 o Th2. En la enfermedad de Chagas se han propuesto varios mecanismos que tratan de explicar la inducción de autoinmunidad durante la infección por *Tripanosoma cruzi*, incluyendo la activación policlonal linfocitaria inducida por el parásito, el mimetismo molecular y la presentación de epitopes propios crípticos, entre otras (Engman DM y Leon JS, 2002; Pontes-de-Carvalho L et al. 2002). El mimetismo molecular, por ejemplo, se ha propuesto como un mecanismo potencial de patogenicidad en la adquisición de la infección por *T. cruzi* y el desarrollo de la enfermedad; de tal suerte que aquellos individuos que presenten alelos HLA de susceptibilidad, podrían estar presentando péptido que tengan un tipo de reacción cruzada con estructuras propias del individuo, como los receptores b adrenérgicos por ejemplo, y de esta forma contribuyan al desarrollo de la enfermedad, mientras que individuos que presenten alelos HLA de protección, no tienen la habilidad de presentar este tipo de péptidos de reacción cruzada y de esta forma pueden contribuir para evitar el daño autoinmune. Este concepto argumenta que los péptidos microbianos o de agentes patógenos con cierto grado de homología a moléculas peptídicas del propio organismo, podrían estimular la activación de células T propio-reactivas, causando una enfermedad patogénica autoinmune en individuos susceptibles. Por otro lado, cabe la posibilidad de que estos antígenos HLA no sólo puedan tener un efecto individual sobre los

mecanismos patológicos en esta enfermedad, sino que también pueden actuar en combinación con otros genes que les confieran diferente susceptibilidad a desarrollar enfermedad de Chagas o incluso a controlarla en las áreas endémicas de nuestro continente.

De tal suerte, se ha observado que en algunas enfermedades cardiovasculares como Falla cardiaca congestiva, Miocarditis, Cardiopatía isquémica y Cardiomiopatía dilatada, se presentan niveles altos de TNF-α (Maunn DL, 1994, Levin B et al. 1990). Algunos otros trabajos realizados tanto en modelos animales como en humanos con enfermedad de Chagas, también han reportado niveles séricos altos de TNF-α e incluso en algunos tejidos (Derouich Guergour D et al. 2001, Lima ES et al. 2001, Perez-Fuentes R et al. 2003). El TNF-α se expresa en los tejidos infectados como una respuesta de protección y es un factor crítico en el desarrollo a la cronicidad en pacientes infectados con *T. cruzi*, cuando se acumula y persiste en las zonas afectadas por el parásito. Estudios experimentales han revelado que una alta producción de TNF-α en órganos blanco es responsable, al menos en parte, de la severa patología asociada a la fase crónica de ésta enfermedad (Derouich Guergour D et al. 2001, Lima ES et al. 2001). Estas observaciones nos dan la posibilidad de pensar que las formas cardiacas de la Enfermedad de Chagas están relacionadas con una predisposición genética de los individuos para producir TNF-α. En este sentido, se ha observado que el polimorfismo del promotor de TNF-α tiene un efecto importante sobre la actividad transcripcional del mismo gen (Braun N et al. 1996, Kroeger KM et al. 1997, Wilson AG et al. 1997), aunque algunos estudios muestran que no existen diferencias significativas en la actividad transcripcional del gen para TNF-α relacionada con el polimorfismo -308G y -308A (Brinkman BM et al. 1995, Uglialoro AM et al. 1998). Por otro lado, diversos estudios relacionados con el polimorfismo del promotor TNF-238, han

reportado que dicho polimorfismo no tiene relevancia fisiológica (Brinkman BM et al. 1995, Uglialoro AM et al. 1998) e incluso Beraun y colaboradores informaron que el loci del polimorfismo de TNF no está asociado con la enfermedad de Chagas (Beraun Y et al. 1998). En el presente trabajo se corrobora la ausencia de asociación entre el polimorfismo del promotor TNF-238 y la enfermedad de Chagas, estudiando dos sitios polimórficos del promotor de TNF (-238 y -308) en un grupo de pacientes infectados con *T. cruzi* con y sin cardiomiopatía. El grupo total de individuos infectados (con y sin CCC) mostró incremento en la frecuencia del alelo TNF-308 T2 (A) cuando se comparó con el grupo control seronegativo, sugiriendo entonces que dicho alelo puede estar relacionado con la susceptibilidad a padecer la enfermedad de Chagas. Cuando se compararon los individuos asintomáticos y los pacientes crónicos entre ellos y con el grupo control, se encontraron diferencias significativas entre los individuos crónicos comparados con los asintomáticos y con los sanos. El alelo TNF-308 T2 sólo estuvo incrementado en el grupo de pacientes con enfermedad crónica, lo cual sugiere que dicho alelo se encuentra involucrado directamente con la susceptibilidad genética a desarrollar la fase crónica de la enfermedad. En estudios previos se reportó que los pacientes con enfermedad de Chagas crónica presentaron niveles séricos altos de TNF-α que correlacionaron significativamente con el grado de disfunción cardiaca (Talvani A et al. 2004). Los datos moleculares de nuestro estudio correlacionan con dichos estudios serológicos, además de que se ha reportado que el alelo T2 está relacionado con una alta producción de TNF-α y nosotros mostramos que dicho alelo sólo se encuentra en los individuos con CCC. Por otro lado, las frecuencias alélicas T1 y del genotipo T1T1 se observaron disminuidas en el grupo de pacientes crónicos al compararlas con los asintomáticos y con los individuos sanos, lo cual puede indicar que dicho alelo y

genotipo se encuentren relacionados con la resistencia a desarrollar la fase crónica de esta enfermedad.

Finalmente, hemos podido observar, de acuerdo a los datos que arroja esta parte del trabajo, que la enfermedad de Chagas está asociada con el polimorfismo de TNF-α en la población Mexicana, y que el alelo TNF-308 T2 puede ser un marcador involucrado en el desarrollo de la fase crónica de la enfermedad. Sin embargo, este tipo de asociación se debe corroborar en otros estudios, con lo cual podríamos sugerir que la detección del alelo -308 T2 en individuos infectados con *Tripanosoma* cruzi, podría usarse como un marcador pronóstico en la progresión del daño cardiaco en pacientes con enfermedad de Chagas.

VIII. CONCLUSIONES:

El estudio del estado inmunológico de los individuos infectados con *Tripanosoma cruzi*, además del perfil de antígenos HLA clase I (HLA-A y –B) y clase II (HLA-DR) y del polimorfismo de las regiones promotoras -238 y -308 del gen que codifica para el TNF-α, comparado con sus equivalentes observados en una población aparentemente sana, sin infección por éste parásito ni enfermedad cardiaca de algún tipo, nos ha llevado a las siguientes conclusiones:

- Todos los pacientes con CCC presentaron cardiomiopatía dilatada.
- Los datos clínicos más constantes en los pacientes con CCC fueron: bloqueo parcial o completo de la rama derecha, taquicardia y extrasístoles ventriculares
- Los individuos infectados (asintomáticos o con CCC) poseen un mayor número de células T (CD4+ o CD8+) activadas.
- Los individuos infectados (asintomáticos o con CCC) presentaron mayor cantidad de células reguladoras ($CD4^+$ $CD25^+$) que los individuos sanos.
- Se observó disminución de la expresión de IL-2, IFN-γ e IL-4 en los individuos infectados con *T. cruzi*.
- Las células $CD4^+$ $CD25^+$ posiblemente suprimen la expresión de IL2 e IFN-γ en los individuos infectados con *T. cruzi*.
- No se detectó una polarización de la respuesta inmune en los individuos infectados (asintomáticos y crónicos) de acuerdo a las citocinas medidas por citoflourometría en cada individuo.

- El HLA-B35 y el HLA-DR16 incrementados en los pacientes crónicos podrían conferir susceptibilidad al desarrollo de la CCC.
- La disminución de la Frecuencia génica del HLA-A68 y el HLA-B39 en los pacientes crónicos podría tener un papel protector.
- Estos resultados sugieren una participación importante de los alelos del SPH en la susceptibilidad al desarrollo de la Enfermedad de Chagas.
- La enfermedad de Chagas está asociada con el polimorfismo del promotor -308 del TNF-α en la población Mexicana y el alelo TNF-308 T2(A) puede ser un marcador pronóstico en la progresión del daño cardiaco, principal factor de morbilidad y mortalidad en la tripanosomosis americana.

IX. BIBLIOGRAFÍA:

Abbas K. Abul, Lichtman H. Andrew, Pober S. Jordan, Inmunología celular y Molecular, Edit. Interamericana McGraw-Hill, Tercera edición, España 1998, p. 148.

Abrahamsonh IA, Galvao SA Coffman RL. 2000. Effects of Interleukin-4 deprivation and treatment on resistance to *Trypanosoma cruzi*. Infect Immunity. 68(4):1975-1979.

Aliberti JC, Cardoso MA, Martins GA, Gazzinelli RT, Vieira LQ, Silva JS. 1996. Interleukin-12 mediates resistance to *Trypanosoma cruzi* in mice and is produced by murine macrophages in response to live tripomastigotes. Infect Immunol. 64:1961-1967.

Andrade SG. 1990. Influence of *Trypanosoma cruzi* strain on the pathogenesis of chronic myocardiopathy in mice. Mem Inst Oswaldo Cruz. 85:17-27.

Andrade V, Barral-Netto M, Andrade SG, Magalhaes JB. 1985. Immunological aspects of infection of 6 inbred strains of mice by 3 different strains of *Trypanosoma cruzi*. Mem Inst Oswaldo Cruz. 80:203-211.

Andrade SG and Magalhaes JB. 1996. Biodemes and Zymodemes of *Trypanosoma cruzi* strains: correlations with clinical data and experimental pathology. Rev Soc Bras Med Trop. 30:27-35.

Araujo F. 1985. *Trypanosoma cruzi*: Expression of antigens on the membrane surface of parasitized cells. J. Immunol. 6: 41-49.

Bahia-Oliveira LM, Gomes JA, Rocha MO, Moreira MC, Lemos EM, Luz ZM, Pereira ME, Coffman RL, Dias JC, Cancado JR, Gazzinelli G, Correa-Oliveira L. 1998. IFN-gamma in human Chagas' disease: protection or pathology?. Braz J Med Biol Res. 31: 127-131.

Barbosa Jr AA, Andrade ZA. 1984. Identificacao do *Trypanosoma cruzi* nos tecidos extracardíacos de portadores de miocardite cronica chagásica. Ver Soc Bras Med Trop. 17: 123-126.

Bell DA, Maddison PJ. 1980. Serologic subsets in systemic lupus eythematosus. An examination of autoantibodies in relationship to clinical features of disease and HLA antigens. Arthritis Rheum. 23:1268-1273.

Beltran E. 1949. Hallazgo de *Schizotrypanum cruzi* en una rata *Rattus norvegicus* de la Ciudad de México. Rev Soc Mex Hist Nat. 10(1-4): 15.

Beraun Y, Nieto A, Collado MD, Gonzalez A, Martin J. 1998. Polymorphysms at tumor necrosis factor (TNF) loci are not associated with Chagas'disease. Tissue Antigens. 52: 81-83.

Biagi F, Tay J, Guzmán C, Fog F. 1964. Tetitlán, Guerrero. Foco endémico de la enfermedad de Chagas. Rev Fac Med México. 6(9): 625-631.

ARCHIVO HISTORICO

Biron CA, Gazzinelli RT. 1995. Effects of interleukin-12 on immune responses to microbial infections: A key mediator in regulating disease outcome. Curr Biol. 7:485-496.

Bjorkman PJ, Saper MA, Samraoui B, Bennett WS, Strominger JL, Wiley DC. 1987. Structure of the human class I histocompatibility antigen HLA-A2. Nature. 329(6139):506-512.

Borda EP, Cossio P, De la Vega M, Arana R. 1984. Circulating IgG in Chagas' disease which binds to β adrenoreceptors of myocardium and modulates their activity. Cli Immunol. 57: 679-686.

Braun N, Michel U, Ernst BP, Metzner R, Bitsch A, Weber F. 1996. Gene polymorphism at position -308 of the tumor necrosis factor-alpha (TNF-alpha) in multiple sclerosis and its influence on the regulation of TNF-alpha production. Neurosci Lett. 215:75-78.

Brener Z, Andrade ZA, Barral-Netto M. 2000. *Trypanosoma cruzi* e doenca de Chagas, 2nd ed., Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, Brasil. 431p.

Brinkman BM, Zuijdeest D, Kaijzel EL, Breedveld FC, Verweij CL. 1995. Relevance of the tumor necrosis factor-alpha (TNF-alpha) -308 promoter polymorphism in TNF-alpha gene regulation. J Inflamm. 46:32-41.

Brown JH, Jardetzky TS, Gorga JC, Stern LJ, Urban RG. Strominger JL, Willey DC. 1993. Three-dimensional structure of the class II histocompatibility antigen HLA-DR1. Nature. 364:33-39.

Buckner FS, Wilson AJ, Van Boris WC. 1999. Detection of live *Trypanosoma cruzi* in tissues of infected mice by using histochemical stain for beta-galactosidase. Infect Immunol. 67: 403-409.

Campbell RD, Trowsdale J. 1993. Map of the human MHC. Immunol Today. 14:349-352.

Cavelli S, Bodmer F. 1980. The genetic of human population. APII. Segregation and linkage analysis in human pedigrees and the stimation of gene frecuencies.; pp: 851.

Cardillo F, Voltarelli JC, Reed SG, Silva JS. 1996. Regulation of *Trypanosoma cruzi* infection in mice by gamma interferon and interleukin-10: Role of NK cells. Infect Immun. 64:128-134.

Chagas C. 1909. Nova Tripanozomiaze humana. Estudos sobre a morfolojia e o ciclo evolutivo do *Schizotripanum cruzi n.gen.,n.sp.*, ajente etiolojico de nova entidade morbida do homem. Mem. Inst. Oswaldo Cruz. 1:159-218.

Chiale PA, Rosenbaum MB, Elizari MV, Hjalmarson A, Magnusson Y, Wallucat G, Hoebeke J. 1995. High prevalence of antibodies against beta 1 and beta 2-adrenoreceptors in patients with primary electrical cardiac abnormalities. J Am Coll Cardiol. 26: 864-869.

Choo SY. 1991. Immunogenetics of the HLA system. Yonsei Med J. 32(1):1-8.

Colorado IA, Acquatella H, Catalioti F, Fernandez MT, Layrisse Z. 2000. HLA class II DRB1, DQB1, DPB1 polymorphism and cardiomyopathy due to *Trypanosoma cruzi* chronic infection. Hum Immunol. 61:320.

Corzo D, Salazar M, Granja CB, Yunis EJ. 1995. Advances in HLA genetics. Exp Clin Immunogenet. 12(3):156-170.

Costa PC, Fortes FS, Machado AB, Almeida NA, Olivares EL, Cabral PR, Pedrosa RC, Goldenberg RC, Campos de Carvalho AC, Masuda MO. 2000. Sera from chronic chagasic patients depress cardiac electrogenesis and conduction. Braz J Med Biol Res. 33: 439-446.

Cossio PM, Diez C., Szarfman A, Kreutzer E, Candiolo B, Arana RM. 1974. Chagasic cardiopathy: demonstration of a serum gamma globulin factor which reacts with endocardium and vascular structures. Circ. 49: 13-21.

Cossio PM, Laguens RP, Dies C, Szarfman A, Segal A, Arana RM. 1974. Chagasic cardiopathy: antibodies reacting with plasma membrane of striated muscle and endothelial cells. Circ. 50: 1252-1259.

Cunha-Neto E and Kalil J. 1995. Autoimmunity in Chagas' Heart disease. Rev Paul Med. 113:757-766.

Cunha-Neto E, Coelho V, Guilherme L, Fiorelli A, Stolf N, Kalil J. 1996. Autoimmunity in Chagas' disease. Identification of cardiac myosin-B13 *Trypanosoma cruzi* protein cross-reactive T cell clones in heart lesions of a chronic Chagas' cardiomyopathy patient. J Clin Invest. 98: 1709-1712.

Dausset J. 1981. The major histocompatibility complex in man. Science. 213:1469-1474.

Deane MP, Sousa MA, Pereira NM, Gonçalves AM, Momen H, Morel CM. 1984. *Trypanosoma cruzi*: Inoculation schedules and re-isolation methods select individual strains from doubly infected mice, as demonstrated by Schizodeme and Zymodeme analyses. J Protozool. 31(2): 276-280.

Deghaide NH, Danatas RO, Donadi EA. 1998. HLA class I and II profiles of patients presenting with Chagas' disease. Dig Dis Sci. 43(2):246-252.

Denticina SS, Ando T, Okuda S, Kinukawa N, Hirakata H, Nagashima A, et al. 1995. Cellular immunity in hemodialysis patients: a quantitative analysis of immune cell subsets by flow cytometry. Am J Nephrol. 15(1):57-65.

De Leo C, Castelán N, López M, González N, Weckmann AL, Melín-Aldama H, Vargas-Alarcón G, Bordes J, Alarcón-Segovia D, Granados J, Ramírez E, Lisker R. 1997. HLA class I and class II alleles and haplotypes in Mexican Mestizos established from serological typing of 50 families. Hum Biol. 69:809.

De Oliveira SF, Pedrosa RC, Nascimnto JH, Campos de Carvalho AC, Masuda MO. 1997. Sera from chronic chagasic patients with complex cardiac arrhythmias depress electrogensis and conduction in isolated rabbit hearts. Circulation. 96: 2031-2037.

Derouich-Guergour D, Brenier-Pinchart MP, Ambroise-Thomas P, Pelloux H. 2001. Tumor necrosis factor alpha receptors: role in the physiopathology of protozoan parasite infections. Int J Parasitol. 31:763-769.

Dubaniewicz A. 2000. HLA-DR antigens in patients with pulmonary tuberculosis in northern Poland. Preliminary report. Arch Immunol Ther Exp (Warsz). 48:47.

Duquesnoy RJ. 1991. Immunogenetics of the human major histocompatibility complex. Clin Lab Med. 11(3):509-536.

Dutra WO, Gollob KJ, Pinto-Dias JC, Gazzinelli G, Correa-Oliveira R, Coffman RL, Carvalho-Parra JF. 1997. Cytokine mRNA profile of peripheral blood mononuclear cells isolated from individuals *Trypanosoma cruzi* chronic infection. Scan J Immunol. 45:74-80.

Eksi S, Wassom DL, Powell MR. 1996. Host genetics and resistance to acute *Trypanosoma cruzi* infections in mice: Profiles and compartmentalisation of IL-2, IL-4, IL-5, IL-10 and INF-γ producing cells. J Parasitol. 82:59-65.

Elkeles G. 1951. On the life cycle of the *Trypanosoma cruzi*. J Parasitol. 37:379.

Engman DM, Leon JS. 2002. Pathogenesis of Chagas heart disease: role of autoimmunity. Acta Trop 81:123.

Fae KC, Drigo SA, Cunha-Neto E, Ianni B, Mady C, Kalil J, Goldberg AC. 2000. HLA and beta-myosin heavy Chain do not influence susceptibility to Chagas disease cardiomyopathy. Microbes Infect. 2(7):745-751.

Ferreira RC, Ianni BM, Abel LC, Buck P, Mady C, Kalil J, Cunha-Neto E. 2003. Increased plasma levels of tumor necrosis factor-alpha in asymptomatic/indeterminate and Chagas disease cardiomyopathy patients. Mem Inst Oswaldo Cruz. 98: 407-411.

Gattass C, Lima M, Nobrega A, Baranski M, Dos Reis G. 1988. Do self-Heart-Reactive T Cells expand in *Trypanosoma cruzi* Immune Host?. Inf. Immunol. 56: 1402-1405.

Giles RC, Capra JD. 1985. Structure, function, and genetics of human class II molecules. Adv Immunol. 37:1-73.

Gloss G, Barrera M de R, Monteón VM, Reyes PA. 1990. Tripanosomiasis Americana y Cardiopatía Chagásica Crónica en el Instituto Nacional de Cardiología "Ignacio Chávez". Arch Inst Cardiol. Méx. 60: 261-266.

Goldsmith RS, Kagan G, Zarate R, Reyes GMA, Cedeño FJ. 1973. El potencial de la transmisión en la enfermedad de Chagas por transfusión sanguínea. Hallazgos serológicos entre donadores en el Estado de Oaxaca. Rev Sal Pub Mex. 4: 439-444.

Gomez P. M. 1984. Caracteristicas da mortalidade urbana por doenca de Chagas, Distrito Federal, Brasil. Bol Of Sanit Panam. 96(33): 213-221.

Gonzales SM, Sannz OP, Muller LA, Molina HA, Fernandez J, Rimoldi MT, Sica RE. 1987. Peripheral nervous system damage in experimental Chronic Chagas disease. Am J Trop Med Hyg. 36: 41-45.

Hernández-Becerril N, Nava A, Reyes PA, Monteón VM. 2001. IgG subclass reactivity to *Trypanosoma cruzi* in chronic chagasic patients. Arch Cardiol Mex. 71:199-205.

Hernandez-Pacheco G, Aguilar-García J, Flores-Domínguez C, Rodríguez-Pérez JM, Pérez-Hernández N, Alvarez-Leon E, Reyes PA, Vargas-Alarcón G. 2003. MHC class II alleles in Mexican patients with Rheumatic Heart Disease. Int J Cardiol. 92:49.

Higuchi ML. 1997. Chronic chagasic cardiopathy: the product of a turbulent host-parasite relationship. Rev Ins Med Trop Sao Paulo. 39:53-60.

Hontebeyrie-Joskowicz M, Said G, Milon G, Marchal G, Eisen H. 1987. L3T4+ T cells able to mediate parasite-specific delayed-type hypersensitivity play a role in the pathology of experimental Chagas' disease. Eur J Immunol. 17: 1027-1033.

Horare C.A.1966. The classifications of mammalian Trypanosomes. Ergehn Microbiol. Immunitatsf u Exper Therap. 39: 43-47.

Hovba V.1980.American Trypanosomiasis Immunological Investigation of Tropical Parasitic Disease. Churchill Livingstone: 49-83.

Hubsch R, Sulzer J, Kagan I. 1976. Evaluation of an autoimmune type antibody in the sera of patients with Chagas' disease. J Parasitol. 62: 523-527.

Hunter CA, Ellis NL, Slifer T, Kanaly S, Grunig G, Fort M, Rennick D, Araujo FG. 1997. IL-10 is required to prevent immune hyperactivity during infection with *Trypanosoma cruzi*. J Immunol. 158:3311-3316.

Kaplan D, Ferrari I, Bergami PL, Mahler E, Levitus G, Chiale P, Hoebeke J, Van Regenmortel MH, Levin MJ. 1997. Antibodies to ribosomal P proteins of *Trypanosoma cruzi* in Chagas disease possess functional auto reactivity with heart tissue and differ from anti-P autoantibodies in lupus. Proc Natl Acad Sci USA. 94: 10301-10306.

Khoury I, Dies C, Cossio PM, Arana RM. 1983. Heterophil nature of EVI antibody in *Trypanosoma cruzi* infection. Clin Immunol Immunopath. 27: 283-288.

Koberle F, Nador E. 1955. Etiologia e patogenia do megaesofago no Brasil. Rev. Paul. Med. 47: 643-661.

Koberle F. 1974. Pathogenesis of Chagas Disease. In Trypanosomiasis and Leshmaniasis with special reference to Chagas' disease. CIBA Foundation Symposium 20. Amsterdam, Elsevier. pp. 137-158.

Koller BH, Geraghty DE, De Mars R, Duvick L, Rich SS, Orr HT. 1989. Chromosomal organization of the human major histocompatibility complex class I gene family. J Exp Med. 169(2):469-480.

Krensky AM. 1997. The HLA system, antigen processing and presentation. Kidney Int. 58:S2-7.

Kroeger KM, Carville KS, Abraham LJ. 1997. The -308 tumor necrosis factor alpha promoter polymorphism effects transcription. Mol Immunol. 34:391-399.

Layrisse Z, Fernández MT, Montagnani S, Matos M, Balbas O, Herrera F, Colorado IA, Catalioti F, Acquatella H. 2000. HLA-C*03 is a risk factor for Cardiomyopathy in Chagas disease. Hum Immunol. 61(9):925-929.

Leon JS and Engmam DM. 2001. Autoimmunity in Chagas heart disease. Int J Parasitol. 31:555-561.

Leon JS, Godsel LM, Wang K, Engman DM. 2001. Cardiac myosin autoimmunity in acute Chagas' heart disease. Infect Immun. 69: 5643-5649.

Levin B, Kalman J, Mayer L, Fillit HM, Packer M. 1990. Elevated circulating levels of tumor necrosis factor in severe chronic heart failure. N Engl J Med 323:236-241.

Lima ES, Andrade ZA, Andrade SG. 2001. TNF-alpha is expressed at sites of parasite and tissue destruction in the spleen of mice acutely infected with *Trypanosoma cruzi*. Int J Exp Pathol. 82:327-336.

Loeza F, Vargas-Alarcon G, Andrade F, Vergara Y, Rodriguez-Perez JM, Ruiz-Morales JA, Alarcon-Segovia D, Granados J. 2002. Distribution of class I and class III MHC antigens in the Tarasco Amerindians. Hum Immunol. 63(2):143.

Majurmder S, Kierzenbaum F. 1995. *Trypanosoma cruzi* immunosupresive factor decreases the interleukin-2 mRNA level in culterd normal activated human lymphocytes. Infect Immunity. 63:4546-4549.

Maunn DL, Young JB. 1994. Basic mechanism in congestive heart failure: recognizing the role of proinflammatory cytokines. Chest. 105:897-904.

Mazariego-Aranda MA, Monteón VM, Ballinas-Verdugo A, Hernández-Becerril N, Alejandre-Aguilar R, Reyes PA. 2001. Seroprevalence of human *Trypanosoma cruzi* infection in different geographic zones of Chiapas, México. Rev Soc Bras Med Trop. 34:453-458.

Mazzotti L. 1936. Investigación sobre la existencia de la enfermedad de Chagas en el País: Demostración de Tripanosomas en los reduvídeos transmisores. Medicina. México. 282(16):584-585.

ARCHIVO HISTORICO

Mazzotti L. 1940. Dos casos de enfermedad de Chagas en el Estado de Oaxaca. Gac Med México. 70(4):417-420.

Mejia LH, Tanner MK, Kierszebaum F, Sztein MB. 1993. Alterations induced by *Trypanosoma cruzi* in activated mouse lymphocytes. Parasit Immunol. 15:273-280.

Mendoza JA, Miranda E, Velasco-Castrejón O, Maciel MO. 1995. Cardiopatía Chagásica Crónica. Presentación de 60 casos. Arch Inst Cardiol (Mex).65:546-550.

Menezes CA, Rocha MO, Souza PE, Chavez AC, Gollob KL, Dutra WO. 2004. Phenotypic and functional characteristics of CD28+ and CD28- cells from chagasic patients: distinct repertoire and cytokine expression. Clin Exp Immunol. 137: 129-138.

Meyer CG, Schnittger L, May J. 1996. Met-11 of HLA Class II DP alpha 1 first domain associated with onchocerciasis. Exp Clin Immunogenet. 13:12.

Miller SA, Dykes DD y Polesky HF. 1988. A simple salting out procedure for extracting DNA from human nucleated cells. Nucleic Acids Res. 16:1215.

Monteon VM, Negrete C, Reyes PA. 1996. Chronic chagasic with parasitemic state (Preliminary Report). Arch Med Res. 27:335-337.

Montcon VM, Turrent LC, Amador GF, Reyes PA. 1987. Anticuerpos séricos a *T. cruzi* en donadores de sangre en la Ciudad de México. Bioquímia. 9(47): 6.

Mortara RA, Da Silva S, Patricio FR, Higuchi ML, Lopes ER, Gabbai AA, Carnevale P, Rocha A, Ferreira MS, Souza MM, De Franco MF, Turcato G Jr, Ferraz Neto BH. 1999. Imaging *Trypanosoma cruzi* within tissues from chagasic patients using confocal microscopy with monoclonal antibodies. Parasitol Res. 85: 800-808.

Mosmann TR. 1994. Properties and functions of interleukin-10. Adv Immunol. 56:1-26

Mosmann TR and Sad S. 1996. The expanding universe of T cell subsets: Th1, Th2 and more. Immunology Today. 17:138-146.

Mullis KB. 1990. The usual origin of the polymerase chain reaction. Sci. Am. 262:36-43

Nabors GS, Tarleton RL. 1991. Differential control of interferon-gamma and interleukin-12 production during *T. cruzi* infections. J Immunol. 146:3591-3598.

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

Pan-American Health Organization. 1984. Status of Chagas Disease in the region of the Americas. Epidemiol Bull. 5(2):5-9.

Pereira J.B., Willcox H.P. y Coura, J.R. 1985. Morbidade da Doenca de Chagas. III. Estudo longitudinal de seis anos em Virgem da Lapa, M.G.,Brasil. Mem Inst Oswaldo Cruz. 80(1):63-71.

Pérez-Fuentes R, Sánchez Guillen M, González-Alvarez C, Monteón VM, Reyes PA, Rosales-Encina JL. 1998. Humoral nitric oxide levels and antibody immune response of symptomatic and indeterminates Chagas disease patients to commercial and autochthonous *Trypanosoma cruzi* antigen. Am J Trop Med Hyg. 58: 715-720.

Perez-Fuentes R, Guegan JF, Barnale C, Lopez-Colombo A, Salgado-Rosas H, Torres-Rasgado E, Briones B, Romero-Diaz M, Ramos-Jimenez J, Sanchez-Guillen MC. Severity of chronic Chagas' disease is associated with cytokine/antioxidant imbalance in chronically infected individuals. Int J Parasitol 2003; 33:293-299.

Piccirillo CA, Shevach EM. 2001. Cutting edge: control of CD8+ T cell activation by $CD4^+$ $CD25^+$ immunoregulatory cells. J Immunol. 167:1137-1140.

Pontes-de-Carvalho L, Santana CC, Soares MB, Oliveira GG, Cunha-Neto E, Ribeiro-dos-Santos R. 2002. Experimental chronic Chagas' disease myocarditis is an autoimmune disease preventable by induction of immunological tolerance to myocardial antigens. J Autoimmun 18:131.

Rangel-Flores H, Sánchez B, Mendoza-Duarte J, Bernabé C, Brenieré F, Ramos C, Espinoza B. 2001. Serologic and parasitological demonstration of *Trypanosoma cruzi* infections in an urban area of central México: correlation with electrocardiographic alterations. Am J Trop Med Hyg. 65: 887-895.

Reed E, Lupu F, McManus P, Seigle R, Suciu-Foca N. 1992. Population and family studies of HLA-DR4 by use of oligonucleotide typing. Tissue Antigens. 39:266.

Reed SG, Brownell CE, Russo DM, Silva JS, Grabstein KH, Morrissey PJ. 1994. Interleukin 10 mediates susceptibility to *Trypanosoma cruzi* infection. J Immunol. 153:3135-3140.

Ribeiro Dos Santos R, Hudson L. 1980. *Trypanosoma cruzi*: Binding of parasite antigens to mammalian cell membranes. Paras Immunol. 2: 1-10.

Ribeiro Dos Santos R, Hudson L. 1980. *Trypanosoma cruzi*: immunological consequences of parasite modification of host cell. Clin Exp Immunol. 40: 36-41.

Ribeiro Dos Santos R, Hudson L. 1981. Denervation and the immune response in mice infected with *Trypanosoma cruzi*. Clin Exp Immunol. 44: 349-354.

Ribeiro Dos Santos R, Rossi MA, Laus JL, Silva JS, Savino W, Mengel J. 1992. Anti-CD4 abrogates rejection and re-establishes long-term tolerant to syngeneic newborn hearts grafted in mice chronically infected with *Trypanosoma cruzi*. J Exp Med. 175: 29-39.

Ribeiro Dos Santos R, Mengel JO, Postol E, Soares RA, Ferreira-Fernandez E, Soares MB, Pontes-de-Carvalho LC. 2001. A Heart-specific $CD4^+$ T-cell line obtained from a chronic chagasic mouse induces carditis in heart-immunized mice and rejection of normal heart transplants in the absence of *Trypanosoma cruzi*. Parasite Immunol. 23: 93-101.

Rizzo LV, Cunha-Neto E, Teixeira AR. 1989. Autoimmunity in Chagas' disease: specific inhibition of reactivity of $CD4^+$ T cells against myosin in mice chronically infected with *Trypanosoma cruzi*. Infect Immun. 57: 2640-2644.

Romaña C. 1935. Acerca de un síntoma inicial de valor para el diagnóstico de forma aguda de la enfermedad de Chagas. La conjuntivitis esquizotripanosómica unilateral (Hipótesis sobre la puerta de entrada conjuntival de la enfermedad). MEPRA. 22:16-28.

Ruegsegger LG, Monteón VM, Marcuschamer J, Reyes PA. 1993. Tripanosomiasis Americana (enfermedad de Chagas). Encuesta clínica-serológica en un municipio rural oaxaqueño. Arch Inst Cardiol (Mex). 63:145-148.

Sakaguchi S. 2000. Regulatory T cells: key controllers of immunologic self-tolerance. Cell. 101:455-458.

Salazar PM, de Haro I, Uribarren T. 1988. Chagas disease in Mexico. Parasitol Today. 4:348-351.

Salazar PM, Jimenez J, Tay J, Cardenas L. 1978. Estudio comparativo de la patogenicidad de cuatro cepas de *T cruzi* en el ratón blanco. Rev Lat-amer Microbiol. 20: 51-57.

Salomon B, Lenschow DJ, Rhee L, Ashourian N, Singh B, Sharpe A, Bluestone JA. 2000. B7/CD28 costimulation is essential for the homeostasis of the $CD4^+$ $CD25^+$ immunoregulatory T cells that control autoimmune diabetes. Immunity. 12:431-440.

Saper MA, Bjorkman PJ, Willey DC. 1991. Refined structure of the human histocompatibility antigen HLA-A2 at 2.6 A resolution. J Mol Biol. 219(2):277-319.

Sargent CA, Dunham Y, Trowsdale J, Cambell RD. 1989. Human major histocompatibility complex contains genes for the major heat shock protein HSP70. Proc Natl Acad Sci USA. 86:1968-1970.

Schumins G. A. 1985. In: Infection Immunity and Blood transfusion. Alan R. Ed. Liss Inc. New York. pp. 127-145.

Scott P. 1993. Interleukin-12 initiation cytokine for cell-mediated immunity. Science. 260:496-497.

Shevach EM. 2000. Regulatory T cells in autoimmunity. Ann Rev Immunol. 18:423-449.

Silva JS, Aliberti JC, Martins GA, Souza MA, Souto JT, Padua MA. 1998. The role of IL-12 in *Trypanosoma cruzi* infection. Braz J Med Biol Res. 31:111-115.

Silva JS, Morrissey PJ, Grabstein KH, Moler KM, Anderson D, Reed SG. 1992. Interleukin-10 and interferon-gamma regulation of experimental *Trypanosoma cruzi* infections. J Immunol. 140: 4342.

Silva JS, Twardzik DR, Reed SG. 1991. Regulation of *Trypanosoma cruzi* infections *in vitro* and *in vivo* by Transforming Growth Factor-β (TGF-β). JExp Med. 174:539-545.

Skoog T, van't Hooft FM, Kallin B, Jovinge S, Boquist S, Nilsson J, Eriksson P, Hamsten A. 1999. A common functional polymorphism (C-A substitution at position -863) in the promoter region of the tumor necrosis factor-α (TNF-α) gene associated with reduced circulating levels of TNF-α. Hum Mol Genet. 8:1443-1449.

Soares MBP, Silva-Mota KN, Lima RS, Bellintani MC, Pontes-de-Carvalho L, Ribeiro-dos-Santos R. 2001. Modulation of chagasic cardiomyopathy by interleukin-4: dissociation between inflammation and tissue parasitism. Am J Pathol. 159:703-709.

Soares MBP, Lima RS, Santana CC, Bellintani MC, Pontes-de-Carvalho LC, Ribeiro Dos Santos R. 2001b. Repeated immunization with syngenic Herat antigens sensitizes mice to *Trypanosoma cruzi*-induced myocarditis. Am J Pathol. 159:710-716.

Sosa-Jurado F, Mazariego-Aranda M, Hernández-Becerril N, Garza-Murillo V, Cárdenas M, Reyes PA, Hirayama K, Monteón VM. 2003. Electrocardiographic Findings in Mexican Chagasic

Subjects Living in High and Low Endemic Regions of *Trypanosoma cruzi* Infection. Mem Inst Oswaldo Cruz. 98(5): 605-610.

Talvani A, Rocha MO, Barcelos LS, Gomez YM, Ribeiro AL, Teixeira MM. 2004. Elevated concentrations of CCL2 and tumor necrosis factor-alpha in chagasic cardiomyopathy. Clin Infect Dis. 38:943-950.

Tarleton RL. 2001. Parasite persistence in the aetiology of Chagas disease. Int J Parasitol. 31:550-554.

Tarleton RL, Zhang L, Downs MO. 1997. "Autoimmune rejection" of neonatal heart transplants in experimental Chagas' disease is a parasite-specific response to infected host tissue. Proc Natl Acad Sci USA. 94: 3932-3937.

Tay J, Salazar SPM, Bucio MI, Zárate R, Zárate L. 1980. La enfermedad de Chagas en la República Mexicana. Sal Pub Méx. 22(4-6): 409-450.

Tay J., Salazar S, Velasco M, Haro I, García-Yañez, Gutierrez-Quiroz M. 1979. Estudio epidemiológico de la enfermedad de Chagas en el Estado de Jalisco, República Mexicana. Sal Publ Mex. 21: 145-149.

T.D.R. News letter. 1982. Special program for Research and Training in Tropical Disease. UNDP/WHO. 18:15.

Thornton AM, Shavach EM. 1998. $CD4^+$ $CD25^+$ immunoregulatory T cells suppress polyclonal T cell activation in vitro by inhibiting interleukin 2 production. J Exp Med. 188:287-296.

Trowsdale J. 1987. Genetic and polymorphism class II antigens. Br Med Bull. 43:15-36.

Vago AR, Andrade LO, Leite AA, D'avila Reis D, Macedo AM, Adad SJ, Tostes S Jr, Moreira MC, Filho GB, Pena SD. 2000. Genetic Characterization of *Tripanosoma cruzi* directly from tissues of patients with chronic Chagas disease: differential distribution of genetic types into diverse organs. Am J Pathol 156: 1805-1809.

Uglialoro AM, Turbay D, Pesavento PA, Delgado JC, McKenzie FE, Gribben JG. 1998. Identification of three new nucleotide polymorphisms in the human tumor necrosis factor α gene promoter. Tissue Antigens. 52:359-367.

Vargas-Alarcon G, Gamboa R, Zuniga J, Hernandez-Pacheco G, Ramos-Kuri M, Castillo E, Gomez-Casado E, Martinez-Laso J, Arnaiz-Villena A, Granados J. 2000. HLA-DR4 allele frequencies on Indian and Mestizo population from Mexico. Hum Immunol. 61:341.

Velasco-Castrejon O, Valdespino JL, Tapia-Conyer R, Salvatierra E. 1992. Seroepidemiología de la enfermedad de Chagas en México. Sal Pub (Mex). 34: 186-196.

Vianna GO. 1911. Contribuicao para o estudo da anatomia patológica da "Moléstia de Carlos Chagas" (Esquizotripanoze humana ou tireoidite parasitária). Mem Inst Oswaldo Cruz. 3: 276-294.

Vidal-Acosta V, Ibañez-Bernal S, Martínez-Campos C. 2000. Infección natural de Chinches Triatominae con *Trypanosoma cruzi* asociados a la vivienda humana en México. Sal Pub (Mex). 42:496-503.

Weidebach W, Goldberg AC, Chiarella JM, Guilherme L, Snitcowsky R, Pileggi F, Kalil J. 1994. HLA class II antigens in rheumatic fever. Analysis of the DR locus by restriction fragment-length polymorphism and oligotyping. Hum Immunol. 40(4):253-258.

Weeckmann AL, Vargas-Alarcón G, López N, De Leo C, Castelán N, et al. 1997. Frequencies of HLA-A and HLA-B alleles in a Mexico city mestizo samples. Am J Hum Biol. 9:1-5.

White AG, Bogh J, Leheny W, Kuchipudi P, Varghese M, al Riyami H, al Hashmi S, Daar AS. 1997. HLA antigens in Omanis with blinding trachoma: markers for disease susceptibility and resistance. Br J Ophthalmol. 81:431.

WHO-World Health Organization. 1991. Control of Chagas disease. Report of the WHO expert committee. Geneva. WHO Technical Report Series 811:1-95.

Williams TM. 2001. Human leukocyte antigen gene polymorphism an the histocompatibility laboratory. J Mol Diagn. 3(3):98-104.

Wilson AG, di Giovine FS, Blakemore AI, Duff GW. Single base polymorphism in the human tumor necrosis factor alpha (TNF-alpha) gene detectable by NcoI restriction of PCR product. Hum Mol Genet 1992; 1:353.

Wilson AG, Symons JA, McDowell TL, McDevit HA, Duff GW. 1997. Effects of a polymorphism in the human tumor necrosis factor alpha promoter on transcriptional activation. Proc Natl Acad Sci USA. 94:3195-3199.

Woolf B. On estimating the relation between blood group and disease. Ann Hum Genet 1955; 19:251-253.

Zarate LG, Zarate RJ. 1980. The biology and behaviour of *Triatoma barberi* (Hemiptera: Reduviidae) in Mexico. I. Blood sources and infection with *Trypanosoma cruzi* . J Med Entomol. 17:103-116

Zarate LG, Zarate RJ. 1985. A checklist of the Triatominae (Hemiptera: Reduviidae) of Mexico. Int J Entomol. 27:102-127.

Zavala –Castro JE, Gutiérrez-Flota H, Barrera-Pérez MA, Boli-Solis J, Zavala-Velázquez JE. 1995. Cardiopatía Chagásica crónica detectada en el Hospital General Regional O'Horan, Mérida, Yucatán, México. Arch Inst Cardiol (Mex). 65:541-545.

Zhang L, Tarleton RL. 1996. Characterization of cytokine production in murine *Trypanosoma cruzi* infection by *in situ* immunocytochemestry: Lack of association between susceptibility to and type 2 cytokine production. Eur J Immunol. 26:102-109.

Zhang J, Andrade ZA, Andrade S, Takeda A, Sadigurski M, Ferrans VJ. 1997. Apoptosis in a canine model of acute chagasic myocarditis. Mem Inst Oswaldo Cruz. 92(1):107.

XOCHIMILCO SERVICIOS DE INFORMACION
ARCHIVO HISTORICO

X. ANEXOS

ELSEVIER

MHC Class I and Class II Genes in Mexican Patients With Chagas Disease

David Cruz-Robles, Pedro Antonio Reyes, Víctor Manuel Monteón-Padilla, Alda Rocío Ortiz-Muñiz, and Gilberto Vargas-Alarcón

ABSTRACT: Chagas' disease contributes significantly to cardiovascular morbidity and mortality in several Latin-American countries. Previous studies have reported the effect of the human leukocyte antigen (HLA) molecules in the immune response regulation of *Trypanosoma cruzi* infection, and the association of HLA antigens with heart damage. We studied the major histocompatibility complex (MHC) class I (HLA-A and HLA-B), and class II (HLA-DR) genes in a sample of 66 serologically positive individuals with and without cardiomyopathy, and in 127 healthy controls. The total group of seropositive individuals revealed increased frequencies of HLA-B39 (p_c = 4.3×10^{-5}, odds ratio [OR] = 3.35) and DR4 (p_c = 1.8×10^{-5}, OR = 2.91) when compared to healthy controls. Increased frequencies of HLA-A68 and HLA-B39 were found in asymptomatic individuals when compared to patients with cardiomyopathy (p_c = 0.014, OR = 4.99 and p_c = 0.001, OR = 4.46, respectively). Also, patients with cardiomyopathy exhibited increased frequency of HLA-B35 when compared to healthy controls (p_c = 0.048, OR = 2.56). The HLA-DR16 frequency was increased in patients with cardiomyopathy compared with asymptomatic individuals (p_c = 0.05, OR = No determined) and healthy controls (p_c = 0.02, OR = 5.0). The results suggest that MHC alleles might be associated with the development of chronic infection and with heart damage in Chagas' disease. HLA-DR4 and HLA-B39 could be associated directly with the infection by *T. cruzi*, whereas, HLA-DR16 could be marker of susceptibility to heart damage and HLA-A68 might confer protection to develop cardiomyopathy. *Human Immunology 65, 60–65 (2004).*
© American Society for Histocompatibility and Immunogenetics, 2004. Published by Elsevier Inc.

KEYWORDS: autoimmunity; cardiomyopathy; Chagas disease; genetic susceptibility; HLA alleles

ABBREVIATIONS

HLA	human leukocyte antigens
MHC	major histocompatibility complex
PCR-SSO	polymerase chain reaction–sequence-specific oligonucleotide

INTRODUCTION

The American trypanosomiasis is caused by an intracellular protozoan *Trypanosoma cruzi*, and is the most common cause of congestive heart failure and sudden death in Latin America [1]. From seroepidemiologic studies, the World Health Organization (WHO) estimates as many as 15 to 20 million people are infected in Latin America, and more than 65 million individuals are at risk of infection [2, 3]. The clinical manifestations of Chagas' disease include an acute, and a chronic phase [4]. The acute phase is usually asymptomatic or runs a mild febrile course that subsides within a few weeks, but meningoencephalitis and severe myocarditis may occasionally occur and cause severe disease, even mortality in youngsters. Then a chronic phase develops. Most individuals may remain asymptomatic for life, having circulating antibodies against *T. cruzi* (latent or indeterminate phase). Nearly 30% of infected individual develop the conspicuous cardiac and/or digestive manifestations after 10 to 20 years postinfection. Severe heart disorders, rhythm or conduction abnormalities, or a specific dilated cardiomyopathy generally lead to death. Some develop mega syndromes of the esophagus, colon, or other hollow organs [5].

From the Department of Pathology (D.C-R), Physiology Department (G.V-A), Immunoparasitology Laboratory (V.M.M-P), and Research Direction (P.A.R), Instituto Nacional de Cardiología "Ignacio Chávez,", México D.F.; and Doctorate Program in Biological Sciences (D.C-R), and Health Sciences Department (A.R.O-M), Universidad Autónoma Metropolitana-Iztapalapa, México D.F., México.

Address reprint requests to: Dr. Gilberto Vargas-Alarcón, Department of Physiology, Instituto Nacional de Cardiología "Ignacio Chávez," Juan Badiano No. 1, Tlalpan 14080, Mexico D.F., Tel. +52 (5) 573-29-11, ext 1278; Fax: +52 (5) 573-09-26; E-mail: gvargas63@yahoo.com.

Received June 10, 2003; revised October 10, 2003; accepted October 17, 2003.

© American Society for Histocompatibility and Immunogenetics, 2004
Published by Elsevier Inc

0198-8859/04/$–see front matter
doi:10.1016/j.humimm.2003.10.008

The pathogenesis of heart damage in chronic Chagas' disease is still controversial [6]. Some hypothesis involves denervation, direct cardiac tissue damage by the parasite, type IV hypersensibility, autoimmune mechanisms [7, 8], and a possible genetic predisposition to develop of the chronic disease [9]. The natural course of the disease in humans remains unclear. Murine models revealed that cytotoxic lymphocytes $CD8^+$ T cells are essential to eliminate parasites, and autoimmune mechanisms have been reported to play an important role in the development of chronic Chagas heart disease, both in experimental models and in humans [10, 11]. Previous studies have suggested participation of major histocompatibility complex (MHC) genes on the susceptibility or resistance to *T. cruzi* infection and on the development of cardiac disease [12–16]. Thus, the aim of the present study was to investigate the possible role of MHC genes in determining the susceptibility to *Trypanosoma cruzi* infection as well as in the development of chagasic heart disease in the Mexican mestizo population.

MATERIAL AND METHODS

Studied Patients

The study included 66 unrelated Mexican individuals serologically positive for *T. cruzi*, diagnosed in the Instituto Nacional de Cardiología "Ignacio Chávez." The patients were classified according to clinical, electrocardiograph (ECG), and echocardiogram characteristics as asymptomatic and chronic chagasic cardiopathy patients (CCC). The asymptomatic population (51.5%) consisted of apparently healthy individuals having normal, or minor right bundle branch blockade on ECG, without cardiomegaly. The CCC group (48.5%) included patients with either arrhythmia-related symptoms, five or more extra systoles per minute, embolic episodes, cardiomegaly, or congestive heart failure. Additionally, a group of 127 nonrelated healthy individuals with neither symptoms nor previous diagnosis of Chagas disease was studied as control group. All patients with Chagas disease as well as healthy controls shared the same environmental and socioeconomic living conditions. All study participants were Mexican mestizo and each individual was asked about their birthplace as well as that of their parents and maternal and paternal grandparents. We considered Mexican mestizos only those individuals who for two generations, including their own, had been born in Mexico. A Mexican mestizo is defined as someone born in Mexico who is a descendant of the original autochthonous inhabitants of the region and of individuals, mainly Spaniards of Caucasian and/or Black origin, who came to America during the sixteenth century. The Institutional Ethics and Research Committees approved this study and all patients signed an informed consent.

MHC Class I and II Typing

Genomic DNA was extracted from peripheral blood and used as a template to amplify by the polymerase chain reaction (PCR) the polymorphic second and third exons of the human leukocyte antigen A (HLA-A) and HLA-B genes, and the second exon of the HLA-DR gene. The PCR products were hybridizing with sequence specific oligonucleotides (PCR-SSO) by dot-blot reverse (Amplicor kit, Hoffmann La Roche, Basel, Switzerland) that provided low to medium resolution for HLA-A, HLA-B, and HLA-DR genes. Because the data are presented as serologic equivalents, it is very likely that within each serologic group there is some degree of undetected HLA polymorphism.

In order to achieve a more accurate assessment on the ethnic homogeneity of the control and patient groups, we performed high resolution typing of HLA-DR4 alleles using the PCR sequence-specific oligonucleotide probes (PCR-SSOP) as previously described [17].

Statistical Analysis

The significance of associations was analyzed using Chi-square test and Fisher's exact test; p values were corrected (p_c) multiplying by the number of comparisons and were considered significant when < 0.05. Relative risks were calculated as odds ratios (OR) using 2×2 contingency tables according to Woolf [18].

RESULTS

In the first analysis, we considered together patients with cardiomyopathy and asymptomatic individuals as infected patients. HLA-A, -B and DR frequencies in this group were compared with those in healthy controls (Table 1). This analysis revealed increased frequencies of HLA-B39 ($p_c = 4.3\times10^{-5}$, OR = 3.35) and DR4 ($p_c = 1.8\times10^{-5}$, OR = 2.91) in the infected individuals. Analysis of HLA-DR4 subtypes indicated that in patients and healthy controls the most frequent alleles were DR*0407, *0403, and *0411. The relative distribution of different subtypes was similar in both groups (data not shown). With these data, we considered that patients and healthy controls have similar genetic background.

In order to investigate the effect of MHC genes in the genetic susceptibility to development of the disease, we analyzed the distribution of HLA-A, -B, and -DR antigens separately on chronic chagasic cardiopathy patients (CCC) and asymptomatic individuals as well as in healthy controls. Statistical analysis depicted significant increased frequency of HLA-A68 in the asymptomatic individuals when compared with CCC patients ($p_c = 0.014$, OR = 4.99) and to healthy controls ($p_c = 0.014$, OR = 2.94; Table 2). As can be seen in Table 3, patients with CCC exhibited increased frequency of HLA-B35

TABLE 1 Gene frequencies of HLA-A, -B, and HLA-DR on *T cruzi* infected patients and healthy controls

HLA	Infected patients		Healthy controls		p Value	OR
	n	GF	n	GF		
	(n = 64)		(n = 127)			
A2	50	0 396	76	0 299	NS	1.50
A3	1	0 007	17	0.066	NS	0.11
	(n = 63)		(n = 127)			
B14	2	0 015	14	0.055	NS	0.28
B35	30	0 238	36	0 141	NS	1.89
B39	46	0 365	33	0.129	4.3×10^{-5}	3.35
B48	4	0.031	2	0.007	NS	4 13
B51	2	0.015	17	0.066	NS	0.22
B52	8	0 063	7	0 027	NS	2.39
	(n = 66)		(n = 127)			
DR4	64	0.484	62	0.244	1.8×10^{-5}	2.91
DR7	3	0.022	26	0.102	NS	0.20
DR15	1	0.007	18	0.070	NS	0.10

Only relevant antigens are presented.

Abbreviations GF = gene frequency, HLA = human leukocyte antigen, NS = not significant; OR = odds ratio, p_c = corrected p value.

when compared to healthy controls (p_c = 0.048, OR = 2.56), but not when compared with asymptomatic individuals. On the other hand, the frequency of HLA-B39 was significantly increased in asymptomatic compared with CCC patients (p_c = 0.001, OR = 4.46) and to healthy controls ($p_c < 1\times10^{-5}$, OR = 7.62). Finally, regarding HLA-DR distribution, we found an increase of HLA-DR4 frequency (Table 4) in asymptomatic individuals when compared with healthy controls (p_c = 2×10^{-5}, OR = 3.7) Also, CCC patients revealed increased frequency of HLA-DR4 when compared with healthy controls (p_c = 0.05, OR = 2.26). The HLA-DR16 frequency was increased in CCC patients compared with asymptomatic individuals (p_c = 0.05, OR = not determined) and with healthy controls (p_c = 0.02, OR = 5.0).

DISCUSSION

The fact that some of the individuals living in endemic areas are resistant to becoming infected (seropositive) and that only a few of the chronically infected develop cardiac disease support the important participation of genetic factors in the development of Chagas disease. Because some hypothesis involves autoimmune mechanisms in the development of Chagas disease, the MHC genes have been studied as markers of the genetic susceptibility to the disease. The present study reports the analysis of

TABLE 2 Gene frequencies of HLA-A on Chagas disease patients (asymptomatic and with cardiomyopathy) and healthy controls

HLA	Patients: Asymptomatics (n = 31)		Patients: With cardiomyopathy (n = 33)		Controls (n = 127)	
	n	GF	n	GF	n	GF
A1	2	0.032	2	0.030	18	0.070
A2	22	0.354	29	0.439	76	0.299
A3	0	0.000	1	0.015	17	0.066
A11	1	0.016	0	0.000	10	0.039
A24	13	0.209	13	0.196	43	0.169
A29	2	0.032	0	0.000	11	0 043
A31	2	0.032	9	0.136	14	0 055
A68	18	0.290*	5	0.075	31	0.122

* Increased when compared with cardiomyopathy patients (p_c = 0.014, OR = 4 99) and healthy controls (p_c = 0.014, OR = 2 94)

Only relevant antigens are presented

Abbreviations: GF = gene frequency; HLA = human leukocyte antigen; OR = odds ratio; p_c = corrected p value

TABLE 3 Gene frequencies of HLA-B on Chagas Disease patients (asymptomatic and with cardiomyopathy) and healthy controls

	Patients					
	Asymptomatics (n = 31)		With cardiomyopathy (n = 32)		Controls (n = 127)	
HLA	n	GF	n	GF	n	GF
B7	0	0.000	2	0.031	13	0.051
B14	0	0.000	2	0.031	14	0.055
B15	3	0.048	5	0.078	13	0.051
B35	11	0.177	19	0.296[a]	36	0.141
B39	33	0.532[b]	13	0.203	33	0.129
B40	4	0.064	9	0.140	21	0.082
B44	1	0.016	3	0.046	21	0.082
B48	2	0.032	2	0.031	2	0.007
B51	1	0.016	1	0.015	17	0.066
B52	2	0.032	6	0.093	7	0.027

Only relevant antigens are presented

[a] Increased when compared to healthy controls (p_c = 0.048, OR = 2.56).

[b] Increased when compared to cardiomyopathy patients (p_C = 0.001, OR = 4.46) and healthy controls ($p_C < 1 \times 10^{-3}$, OR = 7.62).

Abbreviations GF = gene frequency; HLA = human leukocyte antigen; NS = not significant, OR = odds ratio; p_c = corrected p value

MHC class I (HLA-A and -B) and class II (HLA-DR) genes in a group of *T. cruzi* seropositive individuals with and without cardiomyopathy. The total group of infected individuals (with and without CCC) indicated increased frequencies of HLA-B39 and HLA-DR4 when compared with seronegative healthy controls, suggesting that these antigens could be related with the infection by *T. cruzi*. These two antigens are the most frequent reported in several healthy American populations, including the Mexicans (both Mestizos and Amerindians) [19–21]. A study in a rural mestizo population from Peru reported a protective effect of the HLA-DR14 DQB1*0301 haplotype in the *T. cruzi* infection; however, they did not detect association with chagasic heart disease [14]. Other reports suggest associations of cardiac damage with both class I and class II alleles, but the results have been heterogeneous [13]. Increased frequencies of HLA-Cw3 antigen and DRB1*01-DQB1*0501 haplotype were reported in a group of cardiomyopathic patients from Venezuela [15, 22]. Also, a significant decrease frequency of the HLAB40-Cw3 haplotype was found among Chilean cardiomyopathy patients as compared

TABLE 4 Gene frequencies of HLA-DR on Chagas Disease patients (asymptomatic and with cardiomyopathy) and healthy controls

	Patients					
	Asymptomatics (n = 34)		With cardiomyopathy (n = 32)		Controls (n = 127)	
HLA	n	GF	n	GF	n	GF
DR1	1	0.014	2	0.031	15	0.059
DR3	7	0.102	0	0.000	11	0.043
DR4	37	0.544[a]	27	0.421[b]	62	0.244
DR7	2	0.029	1	0.015	26	0.102
DR8	7	0.102	13	0.203	41	0.161
DR13	4	0.058	2	0.031	11	0.043
DR14	5	0.073	12	0.187	29	0.114
DR15	1	0.014	0	0.000	18	0.070
DR16	0	0.000	7	0.109[c]	6	0.023

Only relevant antigens are presented

[a] Increased when compared to healthy controls (p_c = 2 × 10^{-3}, OR = 3.7).

[b] Increased when compared to healthy controls (p_c = 0.05, OR = 2.26)

[c] Increased when compared to asymptomatic patients (p_c = 0.05, OR = not determined), and healthy controls (p_c = 0.02, OR = 5.0).

Abbreviations GF = gene frequencies, HLA = human leukocyte antigen; OR = odds ratio; p_c = corrected p value.

with noncardiomyopathics [9]. In our study the comparison of HLA frequencies between patients with cardiomyopathy and asymptomatics demonstrated important differences. Increased frequencies of HLA-A68 and HLA-B39 were found in asymptomatic individuals, suggesting the participation of these antigens in conferring protection for the development cardiac damage in seropositive individuals. This fact is important because these two antigens are the most frequent in American populations and could have an important role in controlling the disease in endemic areas of American continent. The fact that HLA-DR4 was increased in both groups (CCC and asymptomatic) corroborates the participation of this antigen in the genetic susceptibility to *T. cruzi* infection. On the other hand, the increased frequency of HLA-DR16 in patients with cardiomyopathy, when compared with healthy controls and asymptomatic individuals, suggest that this antigen could be associated with the genetic susceptibility to cardiac damage in these individuals. HLA-DR16 has also been associated with other autoimmune diseases in which infectious agents play an important role [23–26]. The same effect could have the HLA-B35; this antigen was increased in patients with cardiomyopathy when compared with healthy controls but not when compared with asymptomatic individuals. However, the frequency of HLA-B35 was significantly increased in 33 unrelated Guatemalan with CCC when compared with 138 seronegative controls ($p_c < 0.003$, OR = 5.5) and although there was no associations with MICA nor tumor necrosis factor-α promoter region polymorphism, the increased risk for the individuals who had both HLA-B35 and MICA-A5 was higher than the sum of the increased risks for either HLA-B35 or MICA-A5 single positive individuals, suggesting that the effects of the two alleles are synergistic [16]. Unfortunately we did not test for MICA markers in our study.

The mechanism by which HLA genes could determine susceptibility to Chagas disease is not completely understood. The MHC genes regulate immune response to infections, bind and present antigens to T cells, and have an important role in T-cell repertoire selection. In Chagas disease a number of mechanisms may explain the induction of autoimmunity during *T. cruzi* infection, including parasite-induced polyclonal lymphocyte activation, molecular mimicry, bystander activation, and presentation of cryptic self-epitopes [27, 28]. Due to that molecular mimicry it has been proposed as a potential mechanism for *T. cruzi* infection leading to Chagas disease, individuals with susceptibility HLA alleles could present cross-reactive peptides and develop the disease, whereas individuals with protector HLA alleles failed to present these cross-reactive peptides. This concept argues that a microbial peptide with certain degree of homology to a self-peptide can stimulate pathogenic self-reactive specific T cells to cause an autoimmune disease in genetically susceptible individuals.

In summary, the present work in Mexican seropositive individuals, both asymptomatic and with cardiomyopathy, demonstrates three types of associations: association with *T. cruzi* infection (HLA-B39, HLA-DR4); association with protection to development cardiac damage (HLA-A68 and HLA-B39); and association with development of cardiomyopathy (HLA-DR16, HLA-B35). These antigens could act alone or in combination with other genes to confer differential susceptibility to Chagas disease and also to control the disease in endemic areas of the American continent.

ACKNOWLEDGMENTS

Our gratitude to the patients; to QFB Nidia Hernández Becerril and MVZ Verónica Garza Murillo of the Immunoparasitology Laboratory; and to QBP Guadalupe Hernández-Pacheco from Molecular Biology Laboratory of the Physiology Department at the Instituto Nacional de Cardiología "Ignacio Chávez," for their technical assistance. This work was partially supported by National Council of Science and Technology (CONACyT, México), and by the fellowship number 91608.

REFERENCES

1. Hontebeyrie-Joskowicz M: Immunoregulatory mechanisms and Chagas' disease. Mem Inst Oswaldo Cruz 87: 101, 1992.
2. UNDP/World Bank/WHO Special Programme for Research and Training in Tropical Diseases. Tropical disease research: progress 1975–1994, highlights 1993–1994. In: Twelfth Programme Report of the UNDP/World Bank/WHO Special Programme for Research and Training in Tropical Diseases (TDR). Geneva: World Health Organization, 1994.
3. Hagar JM, Rahimtoola SH: Chagas heart disease. Curr Probl Cardiol 20:825, 1995.
4. Morris SA, Tanowitz HB, Wittner M, Bilezikian JP: Pathophysiological insights into the cardiomyopathy of Chagas' disease. Circulation 82:1900, 1990.
5. Rezende JM: The digestive tract in Chagas' disease. Mem Inst Oswaldo Cruz 79:97, 1984.
6. Kalil J, Cunha-Neto E: Autoimmunity in Chagas disease cardiomyopathy: fulfilling the criteria at last? Parasitol Today 12:396, 1997.
7. Rossi MA, Mengel JO: Chronic Chagasic myocarditis pathogenesis: dependence on autoimmune and microvascular factors. Am Heart J 124:52, 1992.
8. Theofilopoulos AN: The basis of autoimmunity: part I. Mechanisms of aberrant self-recognition. Immunol Today 16:90, 1995.
9. Llop E, Rothhammer F, Acuña M, Apt W: HLA Antigens in cardiomyopathic Chilean Chagasics. Am J Hum Genet 43:770, 1988.

10. Tarleton RL: Depletion of CD8+ T cells increases susceptibility and reverses vaccine induced immunity in mice infected with *Trypanosoma cruzi*. J Immunol 144:717, 1990.

11. Kierszenbaum F: Autoimmunity in Chagas' disease. J Parasitol 72:201, 1986.

12. Fernandez-Mestre MT, Layrisse Z, Montagnani S, Acquatella H, Catalioti F, Matos M, Balbas O, Makhatadze N, Dominguez E, Herrera F, Madrigal A: Influence of the HLA class II polymorphism in chronic Chagas' disease. Parasite Immunol 20:197, 1998.

13. Deghaide NH, Danatas RO, Donadi EA: HLA class I and II profiles of patients presenting with Chagas' disease. Dig Dis Sci 43:246, 1998.

14. Nieto A, Beraun Y, Collado MD, Caballero A, Alonso A, González A, Martín J: HLA haplotypes are associated with differential susceptibility to *Trypanosoma cruzi* infection. Tissue Antigens 55:195, 2000.

15. Colorado IA, Acquatella H, Catalioti F, Fernandez MT, Layrisse Z: HLA class II DRB1, DQB1, DPB1 polymorphism and cardiomyopathy due to *Trypanosoma cruzi* chronic infection. Hum Immunol 61:320, 2000.

16. Aida K, Juarez S, Kikuchi M, Gil M, Ayau O, De Lopes MP, Kaneko S, Argueta J, Yanagi T, Matta V, Paz M, Velasquez E, Obispo T, Kimura A, Itoh K, Tada I, Hirayama K: HLA-B35 and MICA-A5 alleles synergistically enhanced the susceptibility to Chagas Heart disease, *Trypanosoma cruzi* infection. MHC 7:63, 2000.

17. Reed E, Lupu F, McManus P, Seigle R, Suciu-Foca N: Population and family studies of HLA-DR4 by use of oligonucleotide typing. Tissue Antigens 39:266, 1992.

18. Woolf B: On estimating the relation between blood group and disease. Ann Hum Genet 19:251, 1955.

19. Loeza F, Vargas-Alarcon G, Andrade F, Vergara Y, Rodriguez-Perez JM, Ruiz-Morales JA, Alarcon-Segovia D, Granados J: Distribution of class I and class III MHC antigens in the Tarasco Amerindians. Hum Immunol 63:143, 2002.

20. De Leo C, Castelán N, López M, González N, Weckmann AL, Melín-Aldama H, Vargas-Alarcón G, Bordes J, Alarcón-Segovia D, Granados J, Ramírez E, Lisker R: HLA class I and class II alleles and haplotypes in Mexican Mestizos established from serological typing of 50 families. Hum Biol 69:809, 1997.

21. Vargas-Alarcon G, Gamboa R, Zuniga J, Hernandez-Pacheco G, Ramos-Kuri M, Castillo E, Gomez-Casado E, Martinez-Laso J, Arnaiz-Villena A, Granados J: HLA-DR4 allele frequencies on Indian and Mestizo population from Mexico. Hum Immunol 61:341, 2000.

22. Layrisse Z, Fernández MT, Montagnani S, Matos M, Balbas O, Herrera F, Colorado IA, Catalioti F, Acquatella H: HLA-C*03 is a risk factor for Cardiomyopathy in Chagas disease. Hum Immunol 61:925, 2000.

23. Dubaniewicz A: HLA-DR antigens in patients with pulmonary tuberculosis in northern Poland. Preliminary report. Arch Immunol Ther Exp (Warsz) 48:47, 2000.

24. White AG, Bogh J, Leheny W, Kuchipudi P, Varghese M, al Riyami H, al Hashmi S, Daar AS: HLA antigens in Omanis with blinding trachoma: markers for disease susceptibility and resistance. Br J Ophthalmol 81:431, 1997.

25. Weidebach W, Goldberg AC, Chiarella JM, Guilherme L, Snitcowsky R, Pileggi F, Kalil J: HLA class II antigens in rheumatic fever. Analysis of the DR locus by restriction fragment-length polymorphism and oligotyping. Hum Immunol 40:253, 1994.

26. Hernandez-Pacheco G, Aguilar-García J, Flores-Domínguez C, Rodríguez-Pérez JM, Pérez-Hernández N, Alvarez-Leon E, Reyes PA, Vargas-Alarcón G: MHC class II alleles in Mexican patients with rheumatic heart disease. Int J Cardiol 92:49, 2003.

27. Engman DM, Leon JS: Pathogenesis of Chagas heart disease: role of autoimmunity. Acta Trop 81:123, 2002.

28. Pontes-de-Carvalho L, Santana CC, Soares MB, Oliveira GG, Cunha-Neto E, Ribeiro-dos-Santos R: Experimental chronic Chagas' disease myocarditis is an autoimmune disease preventable by induction of immunological tolerance to myocardial antigens. J Autoimmun 18:131, 2002.

DTD 5 ARTICLE IN PRESS

Available online at www.sciencedirect.com

SCIENCE DIRECT

ELSEVIER

Immunology Letters xxx (2004) xxx–xxx

Immunology Letters

www.elsevier.com/locate/

Tumor necrosis factor-alpha promoter polymorphism in Mexican patients with Chagas' disease

José Manuel Rodríguez-Pérez[a], David Cruz-Robles[b], Guadalupe Hernández-Pacheco[a], Nonanzit Pérez-Hernández[a], Luis Enrique Murguía[a], Julio Granados[d], Pedro Antonio Reyes[c], Gilberto Vargas-Alarcón[a,*]

[a] Physiology Department, Instituto Nacional de Cardiología Ignacio Chávez, Mexico City, Mexico
[b] Pathology Department, Instituto Nacional de Cardiología Ignacio Chávez, Mexico City, Mexico
[c] Research Direction, Instituto Nacional de Cardiología Ignacio Chávez, Mexico City, Mexico
[d] Immunology and Rheumatology Department, Instituto Nacional de Ciencias Médicas y Nutrición Salvador Zubirán, Mexico City, Mexico

Received 6 July 2004; received in revised form 20 October 2004; accepted 27 October 2004

Abstract

The aim of this study was to investigate whether the promoter's polymorphisms at the TNF alpha (TNF-α) gene were associated with the genetic susceptibility to Chagas' disease. We analyzed the TNF-α (positions −308, and −238) polymorphisms in a sample of 54 serologically positive chagasic individuals and in 169 healthy controls. The patients were divided according to clinical characteristics as asymptomatics ($n = 27$), and chronic chagasic cardiopathy (CCC) patients ($n = 27$). The whole group of patients showed increased frequencies of −308 T2 (A) allele when compared to healthy controls (pC = 0.008, OR = 3.03) When the analysis was carried out separately in asymptomatic and CCC patients, increased frequencies of T2 (A) allele and T1T2 (AG) genotype in the group of patients with CCC were found when compared to asymptomatic individuals (pC = 0.0002 and pC = 0.003, respectively) and healthy controls (pC = 4×10^{-7}, OR = 7.02, and pC = 0.0006, OR = 5.29, respectively). The present study demonstrates that Chagas' disease is associated with TNF-α polymorphisms in the Mexican population. The TNF-308 T2 allele could be directly involved in the genetic susceptibility to the chronic phase of the disease.
© 2004 Published by Elsevier B.V.

Keywords. Cardiomyopathy; Chagas' disease; Genetic susceptibility; Tumor necrosis factor-alpha; *Trypanosoma cruzi*

1. Introduction

Chagas' disease is caused by the intracellular protozoan *Trypanosoma cruzi* and contributes significantly to cardiovascular morbidity and mortality in countries of Latin America. The clinical manifestations of Chagas' disease include an acute, and a chronic phase [1]. The acute phase is usually asymptomatic or runs a mild febrile course that subsides within a few weeks. Then, a chronic phase develops. Most individuals may remain asymptomatic for life, having circulating antibodies against *T. cruzi* (latent or indeterminate phase). Nearly 30% of infected individuals develop the conspicuous cardiac and/or digestive manifestations after 10–20 years post-infection. Severe heart disorders, rhythm or conduction abnormalities, or a specific dilated cardiomyopathy generally lead to death. In spite that the pathogenesis of heart damage in chronic Chagas' disease is still controversial, the participation of autoimmune mechanisms has been suggested [2–6]. The heterogeneity in the clinical expression of Chagas' disease suggests the involvement of genetic factors on its pathogenesis. Different studies have reported several markers of genetic susceptibility to chagasic cardiomyopathy [7]. Results have been inconsistent and new genes such as tumor necrosis factor-alpha (TNF-α) need to be analyzed. The TNF-

* Corresponding author. Tel.: +525 573 29 11x1278; fax: +525 573 09 26.
E-mail address: gvargas63@yahoo.com (G. Vargas-Alarcón)

0165-2478/$ – see front matter © 2004 Published by Elsevier B.V.
doi:10.1016/j.imlet.2004.10.017

α codifies a potent immunomodulator and pro-inflammatory cytokine [8] that mediates diverse pathological processes. High frequency of TNF-α -producing lymphocytes and increased plasma levels of TNF-α have been reported in Chagas' disease patients [9,10]. In addition, Talvani et al. [11] reported a high correlation between the high TNF-α levels and the degree of heart dysfunction. The gene that codifies for TNF-α is located within the major histocompatibility complex (MHC) class III region in human chromosome 6 [12]. This gene contains several polymorphic sites, of which two are the most studied. The first is located at position −238 in relation to the transcription start site, in which the presence of adenine (A) defines the TNF-238 A allele; and, the presence of guanine (G) defines the wild type and more common allele TNF-238 G [13]. The second polymorphism is located at position −308; the presence of G defines the TNF-308 T1 allele and A defines TNF-308 T2 allele [14]. It has been demonstrated that these different allelic forms have functional implications. The TNF-308 T2 allelic form results in a two-fold greater transcription compared to TNF-308 T1 form in PMA-stimulated Jurkat and U937 cells [15]. Thus, the aim of the present study was to investigate the role of TNF-α polymorphisms (−238 and −308 positions) in the genetic susceptibility to *T. cruzi* infection as well as in the development of chagasic heart disease in the Mexican population.

2. Materials and methods

2.1. Studied patients

The study included 54 unrelated Mexican individuals (25 males and 29 females, mean age = 46.25 ± 9.19 years) who had at least two *T. cruzi* positive tests of the next four: ELISA, PCR, IFI or hemoaglutination. The patients were diagnosed at the Instituto Nacional de Cardiologia "Ignacio Chávez". The patients were classified according to clinical, electrocardiographic (ECG), and echocardiographic characteristics as asymptomatics and chronic chagasic cardiopathy patients (CCC). The asymptomatic population (50%) consisted of apparently healthy individuals having normal or minor right bundle branch blockade on ECG, without cardiomegaly. The CCC group (50%) included patients with either arrhythmia-related symptoms, five or more extrasystoles per minute, embolic episodes, cardiomegaly, or congestive heart failure. Additionally, one group of 169 not related healthy individuals with neither symptoms, nor previous diagnosis of Chagas' disease, was studied as control group. All studied individuals (patients and controls) were from the Southeast of Mexico and they shared the same environmental and socioeconomic living conditions. All study participants were Mexican Mestizos and each individual was asked about his birthplace as well as that of his parents, maternal and paternal grandparents. We considered Mexican Mestizos only those individuals who, for two generations, including their own, had been born in Mexico. A Mexican Mestizo is defined as someone born in Mexico who is a descendant of the original autochthonous inhabitants of the region and of individuals, mainly Spaniards of Caucasian and/or Black origin, who came to America during the 16th century. The Institutional Ethics and Research Committees approved this study and all patients signed an informed consent.

2.2. DNA extraction

Genomic DNA from whole blood containing EDTA was isolated by a standard technique [16].

2.3. TNF-238 and TNF-308 polymorphisms

Genotyping for the −238G/A polymorphism was performed using a PCR fragment amplified with modified primers (forward primer 5′-AAACAGACCACAGACCTGGTC-3′ and reverse primer 5′-CTCACACTCCCCATCCTCCCGGATC-3′) that include a restriction site for the *Bam*HI enzyme as previously described [17]. The TNF-308 polymorphism was analyzed using the forward primer 5′-GAGCAATAGGTTTTGAGCGCCAT-3′ and the reverse primer 5′-GGGACACACAAGCATCAAG-3′ to create a restriction site for the *Nco*I enzyme [18]. The PCR products were analyzed by phototyping in 2% agarose gels, stained with ethidium bromide.

2.4. Statistical analysis

Allele and genotype frequencies of TNF-α polymorphisms were obtained by direct counting. Also, Hardy–Weinberg equilibrium was tested using the chi-square test. The differences between groups were determined using Mantel–Haenzel χ^2 analysis, which was combined with the 2 × 2 contingency tables using the EPIINFO statistical program (Version 5.0; USD Incorporated 1990, Stone Mountain, GA, USA). Fisher's exact test was used if the number of any cell was <5. *P* values were corrected according to the number of specificities tested and the number of comparisons performed, with a level of significance established as $pC < 0.05$. Relative risk with 95% confidence intervals (CI) was calculated as the odds ratio (OR), according to Woolf's method [19]. Linkage disequilibrium between HLA and TNF alleles was evaluated using the χ^2-test.

3. Results

Allele and genotype frequencies of TNF-α promoter's polymorphisms (positions −238 and −308) in the whole group of Chagas' disease patients and healthy controls are shown in Table 1. Observed and expected frequencies were in Hardy–Weinberg equilibrium in both studied groups. The whole group of patients showed increased frequency of −308 T2 (A) allele when compared to healthy controls ($pC = 0.008$, OR = 3.03, 95% CI = 1.29–7.12).

Table 1
Allele (af) and genotype frequencies (gf) of TNF-α −238 and −308 in Chagas' disease patients and healthy controls

TNF-α −238	Patients (n = 53)		Controls (n = 169)		pC	OR	95% CI
	n	af	n	af			
Alleles							
A	5	0.047	23	0.068	–	–	
G	101	0.952	315	0.932	–	–	
	Patients (n = 53)		Controls (n = 169)				
	n	gf	n	gf			
Genotypes							
GG	48	0.906	147	0.869	–		
AG	5	0.094	21	0.124	–	–	–
AA	0	0.000	1	0.006	–	–	
TNF-α −308	Patients (n = 54)		Controls (n = 162)				
	n	af	n	af			
Alleles							
T1	95	0.880	310	0.956			
T2	13	0.120	14	0.043	0.008	3.03	1.29–7.12
	Patients (n = 54)		Controls (n = 162)				
	n	gf	n	gf			
Genotypes							
T1T1	43	0.796	148	0.913	–	–	–
T1T2	9	0.166	14	0.086	–	–	
T2T2	2	0.037	0	0.000	–	–	–

pC: p corrected; OR: odds ratio; CI: confidence intervals. Only positive OR values are shown.

Table 2
Allele (af) and genotype frequencies (gf) of TNF-α −238 and −308 on Chagas' disease patients (asymptomatics and with chronic chagasic cardiomyopathy) and healthy controls

TNF-α −238	CCC patients (n = 26)		Asymptomatics (n = 27)		Controls (n = 169)	
	n	af	n	af	n	af
Alleles						
A	4	0.077	1	0.018	23	0.068
G	48	0.923	53	0.981	315	0.932
	CCC patients (n = 26)		Asymptomatics (n = 27)		Controls (n = 169)	
	n	gf	n	gf	n	gf
Genotypes						
GG	22	0.846	26	0.963	147	0.869
AG	4	0.154	1	0.037	21	0.124
AA	0	0.000	0	0.000	1	0.006
TNF-α −308	CCC patients (n = 27)		Asymptomatics (n = 27)		Controls (n = 162)	
	n	af	n	af	n	af
Alleles						
T1	41	0.759	54	1.0	310	0.956
T2	13	0.240[a]	0	0.0	14	0.043
	CCC patients (n = 27)		Asymptomatics (n = 27)		Controls (n = 162)	
	n	gf	n	gf	n	gf
Genotypes						
T1T1	16	0.592[b]	27	1.0	148	0.913
T1T2	9	0.333[c]	0	0.0	14	0.086
T2T2	2	0.074[d]	0	0.0	0	0.000

[a] Increased when compared to asymptomatics (pC = 0.0002, OR = undefined) and healthy controls (pC = 4×10^{-7}, OR = 7.02, 95% CI = 2.87–17.22).
[b] Decreased when compared to asymptomatics (pC = 0.0006, OR = undefined).
[c] Increased when compared to asymptomatics (pC = 0.003, OR = undefined) and healthy controls (pC = 0.0006, OR = 5.29, 95% CI = 1.8–15.46).
[d] Increased when compared to healthy controls (pC = 0.012, OR = undefined).

In order to establish the participation of TNF-α promoter's polymorphisms in the development of the CCC, we separately analyzed the frequencies on CCC and asymptomatic individuals as well as in healthy controls (Table 2). Statistical analysis showed increased frequencies of T2 (A) allele and T1T2 (AG) genotype in the group of patients with CCC when compared to asymptomatic individuals (pC = 0.0002, OR = undefined, and pC = 0.003, OR = undefined, respectively) and healthy controls ($pC = 4 \times 10^{-7}$, OR = 7.02, 95% CI = 2.87–17.22 and pC = 0.0006, OR = 5.29, 95% CI = 1.8–15.46, respectively). All the T2 (A) allele positive patients presented chronic chagasic cardiopathy. Also, decreased frequencies of T1 (G) allele were found in CCC patients when compared to asymptomatic individuals (pC = 0.0002, OR = undefined) and healthy controls ($pC = 4 \times 10^{-7}$, OR = 0.14, 95% CI = 0.06–0.35). The CCC patients showed increased frequency of T2T2 (AG) genotype when compared to healthy controls (pC = 0.012, OR = undefined) and decreased frequency of T1T1 (GG) genotype when compared to asymptomatic individuals (pC = 0.0006, OR = undefined).

Finally, HLA-DR16 allele was not in linkage disequilibrium with −308 T2 (A) allele in the Chagas' disease patients ($P > 0.05$) (data not shown).

4. Discussion

Previous studies have reported increased levels of TNF-α in cardiovascular diseases such as congestive heart failure, myocarditis, ischemic heart disease and dilated cardiomyopathy [20–24]. In Chagas' disease high levels of TNF-α in plasma and in some tissues have been reported both in humans and animal models [25–27]. A critical factor for the development of chronic disease in patients infected with *T. cruzi*, is the persistence and amount of TNF-α, that is produced by the host in response to infection. Experimental studies have suggested that high TNF-α production in the target organ of the disease is responsible, at least in part, for the severe pathology associated with the later stages of infection [26,27]. These observations raise the possibility that the cardiac form of Chagas' disease is related to the genetic propensity of an individual to produce TNF-α. Some studies indicate that TNF-308 polymorphism has a significant effect on transcriptional activity [14,15,28], but others have been unable to demonstrate a difference in transcriptional activity between −308G and −308A alleles [29,30]. On the other hand, the −238 polymorphism has been studied in several works but the findings do not have physiological relevance [17,30], and Beraun reports that polymorphisms at TNF loci are not associated with Chagas' disease [31]. The genetic structure of the population studied by Beraun could be different than Mexican Mestizo population and it might be a reason of different findings in these populations. The lack of association between −238 polymorphic site and Chagas' disease is corroborated in the present work which reports the analysis of these two TNF polymorphisms (−238 and −308 positions) in a group of *T. cruzi* seropositive individuals with and without cardiomyopathy. The total group of infected individuals (with and without CCC) showed increased frequency of TNF-308 T2 (A) allele when compared to seronegative healthy controls, suggesting that this allele could be associated with the Chagas' disease susceptibility. When comparing asymptomatic and chronic patients between each other and with healthy controls, we found differences between the chronic group compared with asymptomatics and with healthy controls. The −308 T2 allele was only present in patients with chronic disease suggesting that this allele is directly involved in the genetic susceptibility to develop the chronic phase of the disease. Previous studies reported that patients with more severe Chagas' disease had elevated plasma levels of TNF-α and high correlation between these levels and the degree of heart dysfunction [11]. Our molecular data correlate with these serological studies because it has been reported that T2 allele is related with high production of TNF-α and we detected that this allele is only present in individuals with chronic Chagas heart disease. On the other hand, the T1 and T1T1 frequencies were decreased in the chronic group when compared with asymptomatic and healthy controls, which might have been related with the resistance to develop this chronic phase of the disease. Chagas' disease has been associated with HLA alleles in several populations including the Mexicans. In Mexican patients, Chagasic cardiomyopathy was associated with HLA-DR16 alleles [32]. In the present work we reported association with TNF-308 T2 allele. In order to know if this association is independent of that conferred by HLA alleles we calculated the linkage disequilibrium between them. HLA-DR16 and −308 T2 alleles were not in linkage disequilibrium suggesting that they have independent effect in the susceptibility to Chagasic cardiomyopathy in our population.

It is well known that in addition to mechanical damage by *T. cruzi*, the production of pro-inflammatory cytokines within the myocardium participates in the pathophysiology of acute Chagasic cardiomyopathy. Several studies report that cytokines such as IFN-gamma, IL-1, IL-6 and TNF-alpha modulate the expression of adhesion molecules which participate in the inflammatory process [33–36]. This contributes to the progression of the local inflammatory reaction in the disease. Polymorphic sites in that cytokines have been reported and its study could help to define its role in the progression of Chagas' cardiomyopathy.

In conclusion, the present study demonstrates that Chagas' disease is associated with TNF-α polymorphisms in the Mexican population. The TNF-308 T2 allele could be a marker involved in the chronic phase of the disease. However, additional studies in a larger number of patients could help to establish the true significance of this association. Finally, if this association is corroborated in other studies, the detection of −308 T2 allele could be used as a prognostic marker for the development of cardiac damage in Chagas' disease patients.

Acknowledgement

This work was partially supported by the National Council of Science and Technology (CONACyT, Mexico)

References

[1] Engman DM, Leon JS. Pathogenesis of Chagas heart disease: role of autoimmunity. Acta Trop 2002;81:123–32.

[2] Cunha-Neto E, Kalil J. Heart-infiltrating and peripheral T cells in the pathogenesis of human Chagas' disease cardiomyopathy. Autoimmunity 2001;34:187–92.

[3] Wallukat G, Nissen E, Morwinski R, Muller J. Autoantibodies against the beta- and muscarinic receptors in cardiomyopathy. Herz 2000;25:261–6.

[4] Retondaro FC, Dos Santos Costa PC, Pedrosa RC, Kurtenbach E. Presence of antibodies against the third intracellular loop of the m2 muscarinic receptor in the sera of chronic chagasic patients. FASEB J 1999;13:2015–20.

[5] Giordanengo L, Maldonado C, Rivarola HW, Iosa D, Girones N, Fresno M, Gea S. Induction of antibodies reactive to cardiac myosin and development of heart alterations in cruzipain-immunized mice and their offspring. Eur J Immunol 2000;30:3181–9.

[6] Kierszenbaum F. Views on the autoimmunity hypothesis for Chagas' disease pathogenesis. FEMS Immunol Med Microbiol 2003;37:1–11.

[7] Williams-Blangero S, VanderBerg JL, Blangero J, Correa-Oliveira R. Genetic epidemiology of *Trypanosoma cruzi* infection and Chagas' disease. Front Biosci 2003;8:337–45.

[8] Ghezzi P, Cerami A. Tumor necrosis factor as a pharmacological target. Meth Mol Med 2004;98:1–8.

[9] Menezes CA, Rocha MO, Souza PE, Chavez AC, Gollob KL, Dutra WO. Phenotypic and functional characteristics of CD28+ and CD28− cells from chagasic patients: distinct repertoire and cytokine expression. Clin Exp Immunol 2004;137:129–38.

[10] Ferreira RC, Ianni BM, Abel LC, Buck P, Mady C, Kalil J, Cunha-Neto E. Increased plasma levels of tumor necrosis factor-alpha in asymptomatic/indeterminate and Chagas' disease cardiomyopathy patients. Mem Inst Oswaldo Cruz 2003;98:407–11.

[11] Talvani A, Rocha MO, Barcelos LS, Gomez YM, Ribeiro AL, Teixeira MM. Elevated concentrations of CCL2 and tumor necrosis factor-alpha in chagasic cardiomyopathy. Clin Infect Dis 2004;38:943–50.

[12] Spies T, Morton CC, Nedospasov SA, Fiers W, Pious D, Strominger JL. Genes for the tumor necrosis factors alpha and beta are linked to the human major histocompatibility complex. Proc Natl Acad Sci USA 1986;83:8699–704.

[13] D'Alfonso S, Richardi PM. A polymorphic variation in a putative regulation box of the TNF alpha promoter region. Immunogenetics 1994;38:150–4.

[14] Wilson AG, Symons JA, McDowell TL, McDevit HA, Duff GW. Effects of a polymorphism in the human tumor necrosis factor alpha promoter on transcriptional activation. Proc Natl Acad Sci USA 1997;94:3195–9.

[15] Kroeger KM, Carville KS, Abraham LJ. The −308 tumor necrosis factor alpha promoter polymorphism effects transcription. Mol Immunol 1997;34:391–9.

[16] Miller A. A single salting out procedure for extraction DNA from human nucleated cell. Nucl Acid Res 1998;16:1215–7.

[17] Skoog T, van't Hooft FM, Kallin B, Jovinge S, Boquist S, Nilsson J, Eriksson P, Hamsten A. A common functional polymorphism (C-A substitution at position −863) in the promoter region of the tumor necrosis factor-α (TNF-α) gene associated with reduced circulating levels of TNF-α. Hum Mol Genet 1999;8:1443–9.

[18] Wilson AG, di Giovine FS, Blakemore AI, Duff GW. Single base polymorphism in the human tumor necrosis factor alpha (TNF-alpha) gene detectable by *Ncoi* restriction of PCR product. Hum Mol Genet 1992;1:353.

[19] Woolf B. On estimating the relation between blood group and disease. Ann Hum Genet 1955;19:251–3.

[20] Calabrese F, Carturan E, Chimenti C, Pieroni M, Agostini C, Angelini A, Crosato M, Valente M, Boffa GM, Frustaci A, Thiene G. Overexpression of tumor necrosis factor (TNF) alpha and TNF alpha receptor I in human viral myocarditis: chimeopathologic correlations. Mod Pathol 2004;17:1108–18.

[21] Hogye M, Mandi Y, Csanady M, Sepp R, Buzas K. Comparison of circulating levels of interleukin-6 and tumor necrosis factor-alpha in hypertrophic cardiomyopathy and in idiopathic dilated cardiomyopathy. Am J Cardiol 2004;94:249–51.

[22] Pan JP, Lin TY, Chiang SC, Lin YK, Chou CY, Chan WL, Lai ST. The value of plasma levels of tumor necrosis factor-alpha and interleukin-6 in predicting the severity and prognosis in patients with congestive heart failure. J Chin Med Assoc 2004;67:222–8.

[23] Anker SD, von Haehling S. Inflammatory mediators in chronic heart failure: an overview. Heart 2004;90:464–70.

[24] Tsutamoto T, Wada A, Ohnishi M, Tsutsui T, Ishii C, Ohno K, Fujii M, Matsumoto T, Yamamoto T, Takayama T, Dohke T, Horie M. Transcardiac increase in tumor necrosis factor-alpha and left ventricular end-diastolic volume in patients with dilated cardiomyopathy. Eur J Heart Fail 2004;6:173–80.

[25] Pérez-Fuentes R, Guegan JF, Barnale C, Lopez-Colombo A, Salgado-Rosas H, Torres-Rasgado E, Briones B, Romero-Diaz M, Ramos-Jimenez J, Sanchez-Guillen MC. Severity of chronic Chagas' disease is associated with cytokine/antioxidant imbalance in chronically infected individuals. Int J Parasitol 2003;33:293–9.

[26] Lima ES, Andrade ZA, Andrade SG. TNF-alpha is expressed at sites of parasite and tissue destruction in the spleen of mice acutely infected with *Trypanosoma cruzi*. Int J Exp Pathol 2001;82:327–36.

[27] Derouich-Guergour D, Brenier-Pinchart MP, Ambroise-Thomas P, Pelloux H. Tumor necrosis factor alpha receptors: role in the physiopathology of protozoan parasite infections. Int J Parasitol 2001;31:763–9.

[28] Baseggio L, Bienvenu J, Charlot C, Picollet J, Felman P, Coiffier B, Salles G. Higher LPS-stimulated TNF-alpha mRNA levels in peripheral blood mononuclear cells from non-Hodgkin's lymphoma patients. Exp Hematol 2001;29:330–8.

[29] Brinkman BM, Zuijdeest D, Kaijzel EL, Breedveld FC, Verweij CL. Relevance of the tumor necrosis factor-alpha (TNF-alpha) −308 promoter polymorphism in TNF-alpha gene regulation. J Inflamm 1995;46:32–41.

[30] Uglialoro AM, Turbay D, Pesavento PA, Delgado JC, McKenzie FE, Gribben JG. Identification of three new nucleotide polymorphisms in the human tumor necrosis factor α gene promoter. Tissue Antigens 1998;52:359–67.

[31] Beraun Y, Nieto A, Collado MD, Gonzalez A, Martin J. Polymorphisms at tumor necrosis factor (TNF) loci are not associated with Chagas' disease. Tissue Antigens 1998;52:81–3.

[32] Cruz D, Reyes PA, Monteón-Padilla VM, Ortuz-Muñiz AR, Vargas-Alarcón G. MHC class I and class II genes in Mexican patients with Chagas disease. Hum Immunol 2004;65:60–5.

[33] Martin D, Tarleton R. Generation, specificity, and function of CD8+ T cells in *Trypanosoma cruzi* infection. Immunol Rev 2004;201:304–17.

[34] Michailowsky V, Celes MR, Marino AP, Silva AA, Vieira LQ, Rossi MA, Gazzinelli RT, Lannes-Vieira J, Silva JS. Intercellular adhesion molecule 1 deficiency leads to impaired recruitment of T lymphocytes and enhanced host susceptibility to infection with *Trypanosoma cruzi*. J Immunol 2004;173:463–70.

[35] Hamano S, Himeno K, Miyazaki Y, Ishii K, Yamanaka A, Takeda A, Zhang M, Hisaeda H, Mak TW, Yoshimura A, Yoshida H. WSX-1 is

required for resistance to *Trypanosoma cruzi* infection by regulation of proinflammatory cytokine production. Immunity 2003,19:657–67

[36] Petersen CA, Burleigh BA. Role for interleukin-1 beta in *Trypanosoma cruzi*-induced cardiomyocyte hypertrophy Infect Immun 2003,71 4441–7