Biblioteca Digital
F C E N - U B A

BIBLIOTECA CENTRAL LUIS F LELOIR
BIBLIOTECA CENTRAL LELOIR
FACULTAD DE CIENCIAS EXACTAS Y NATURALES UBA

Tesis Doctoral

Factores genéticos del hospedero asociados a la enfermedad de Chagas: transmisión vertical y cardiopatía chagásica crónica

Juiz, Natalia Anahí

2017-03-01

Este documento forma parte de la colección de tesis doctorales y de maestría de la Biblioteca Central Dr. Luis Federico Leloir, disponible en digital.bl.fcen.uba.ar. Su utilización debe ser acompañada por la cita bibliográfica con reconocimiento de la fuente.

This document is part of the doctoral theses collection of the Central Library Dr. Luis Federico Leloir, available in digital.bl.fcen.uba.ar. It should be used accompanied by the corresponding citation acknowledging the source.

Cita tipo APA:
Juiz, Natalia Anahí. (2017-03-01). Factores genéticos del hospedero asociados a la enfermedad de Chagas: transmisión vertical y cardiopatía chagásica crónica. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires.

Cita tipo Chicago:
Juiz, Natalia Anahí. "Factores genéticos del hospedero asociados a la enfermedad de Chagas: transmisión vertical y cardiopatía chagásica crónica". Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires. 2017-03-01.

EXACTAS UBA
Facultad de Ciencias Exactas y Naturales

UBA
Universidad de Buenos Aires

Dirección: Biblioteca Central Dr. Luis F. Leloir, Facultad de Ciencias Exactas y Naturales, Universidad de Buenos Aires. Intendente Güiraldes 2160 - C1428EGA - Tel. (++54 +11) 4789-9293

Contacto: digital@bl.fcen.uba.ar

UNIVERSIDAD de BUENOS AIRES

Facultad de Ciencias Exactas y Naturales

Factores genéticos del hospedero asociados a la enfermedad de Chagas: transmisión vertical y cardiopatía chagásica crónica

Tesis presentada para optar al título de Doctora de la Universidad de Buenos Aires

en el área Química Biológica

Lic. Natalia Anahí Juiz

Director: Dr. Alejandro G. Schijman

Directora Asistente: Dra. Silvia A. Longhi

Consejera de Estudios: Dra. Silvia G. Rossi

Lugar de trabajo: Laboratorio de Biología Molecular de la Enfermedad de Chagas, Instituto de Investigaciones en Ingeniería Genética y Biología Molecular "Dr Hector N. Torres" (INGEBI-CONICET)

Buenos Aires, 2017

Fecha de defensa: 01 de marzo de 2017

…a mis padres Loli y Fox.

Fueron muchas las personas que me han ayudado y acompañado a lo largo de estos años de Tesis. Mis más infinitos agradecimientos a todos ellos.

En primer lugar quiero agradecer a mi director Alejandro Schijman por confiar en mí y enseñarme que además de ser un excelente científico se puede ser un excelente ser humano. También a mi directora asistente Silvia Longhi por acompañarme y aconsejarme cada día.

De la misma forma quisiera agradecer a todo el Laboratorio de Biología Molecular de la Enfermedad de Chagas y el 222 en general, por su compañía, ayuda y apoyo. En especial a Caro, Juan Carlos, Gonza, Ale, Lean, Laura, Amy, Susana, Maga, Mica, Mati y sobre todo a mi querida Karina.

A los directivos del INGEBI en general por la posibilidad de realizar mi tesis en el instituto y hacerme sentir siempre bienvenida.

Al gran número de colaboradores que participaron de esta Tesis.

A los amigos por tantas cervezas compartidas, especialmente Kika y Magui.

A mi enorme y hermosa familia que incondicionalmente me ha apoyado en todos los aspectos posibles. Y en especial a mis padres, por darme las raíces que me han fortalecido como persona y las alas para poder llegar aún más lejos.

RESUMEN

La enfermedad de Chagas es producto de una compleja interacción entre factores ambientales, del parásito *Trypanosoma cruzi* y del hospedero. En el marco de esta Tesis nos hemos enfocado en describir el rol que estos últimos juegan en dos escenarios de alto impacto en salud pública como son la transmisión congénita y la cardiopatía chagásica crónica.

La transmisión congénita es parcialmente responsable de la urbanización del Chagas, que puede perpetuarse en sucesivas generaciones. Aún no han sido esclarecidos los mecanismos que la placenta ofrece en defensa contra la infección, así como tampoco por qué sólo una proporción de niños nacidos de madres infectadas adquieren Chagas congénito.

Con el objetivo de describir la respuesta genética del microambiente placentario producido frente a la infección, hemos realizado un estudio de genómica funcional a través de un microarreglo en modelo murino C57BL/6J, comparando placentas de animales no infectados e infectados por dos cepas de *T. cruzi*: K98, no letal y miotrópica y VD, aislada de un caso humano de infección congénita. Nuestro análisis de redes biológicas sugiere que el microambiente placentario ejerce una fuerte respuesta inmune en detrimento del metabolismo celular modulada por la cepa parasitaria. Más aún, las diferencias encontradas entre ambas cepas podrían ser el resultado de un tropismo placentario observado en VD.

Por otra parte, en el marco de esta Tesis se han evaluado polimorfismos de nucleótido simples (SNPs) en genes que codifican para enzimas de expresión placentaria como marcadores genéticos de susceptibilidad a esta transmisión. Para analizar dicha asociación hemos realizado un estudio del tipo caso-control comparando dos grupos de niños con y sin infección congénita nacidos de madres seropositivas. Para la genotipificación de las muestras de ADN humano, hemos diseñado técnicas de análisis de curvas de disociación de alta resolución para análisis de SNPs y de electroforesis capilar para análisis de microsatélites. Los resultados obtenidos del estudio de 11 sitios sugieren un papel importante en la infección congénita por parte de los polimorfismos en los

genes de las proteínas MMP2 y ADAM12, implicadas en procesos de remodelación de la matriz extracelular y en la respuesta inmune.

El último objetivo de este trabajo ha sido evaluar polimorfismos en los genes *CCR2* y *CCR5* como posibles marcadores genéticos de susceptibilidad a desarrollar la cardiopatía chagásica crónica en poblaciones originarias de Argentina. En particular, hemos encontrado que individuos de la etnia *wichi*, con menor prevalencia de problemas cardíacos, no presentan una de las mutaciones en *CCR5*, que es factor de riesgo en poblaciones *no-wichi*.

PALABRAS CLAVES: *Trypanosoma cruzi*, infección congénita, cardiopatía chagásica crónica, polimorfismos genéticos, placenta, expresión génica.

Host genetic factors associated with Chagas disease: vertical transmission and chronic chagasic cardiopathy

ABSTRACT

Chagas disease is caused by a complex interaction of environmental factors, *Trypanosoma cruzi* parasite and host. As part of this Thesis we have focused on describing the role that host factors play in two scenarios of high public health impact as congenital transmission and chronic Chagas cardiomyopathy.

Congenital transmission is partially responsible for the urbanization of Chagas, which can remain in the following generations. Until now, it has not been elucidated the mechanisms that the placenta provides as defense against infection, nor why only a proportion of children born to infected mothers acquire congenital Chagas.

In order to describe the genetic response of the placental environment produced during infection, we performed a study of functional genomics using a microarray approach in a C57BL/6J murine model, comparing placentas from uninfected and infected animals by two strains of *T. cruzi*: K98, a non-lethal myotropic strain and VD, isolated from a human case of congenital infection. The analysis of biological networks suggests that the placenta environment exerts a strong immune response to the detriment of cell metabolism modulated by the parasitic strain. Moreover, the differences between the two strains could be the result of a stronger placental tropism in the VD strain.

Moreover, in the framework of this Thesis we have evaluated single nucleotide polymorphisms (SNPs) in genes coding for enzymes of placental expression as genetic markers of susceptibility to vertical transmission. To analyze the association we performed a case-control study comparing two groups of children with and without congenital infection born to seropositive mothers. In order to genotype human DNA samples, we have designed techniques of high resolution melting analyses for SNPs discrimination and capillary electrophoresis for analysis of microsatellites. The results of the 11 *loci* studied suggest an important role in congenital infection by human

polymorphisms in genes coding for MMP2 and ADAM12 proteins, involved in extracellular matrix remodeling processes and in immune response.

The last aim of this research was to evaluate polymorphisms in *CCR2* and *CCR5* genes as potential genetic markers of susceptibility to develop chronic Chagas cardiomyopathy in populations from Argentina. In particular, we have found that individuals belonging to the wichi ethnia, with lower prevalence of heart problems, do not exhibit one of the mutations in *CCR5*, a risk factor in *non-wichi* populations.

KEYWORDS: *Trypanosoma cruzi*, chronic Chagas cardiomyopathy, congenital infection, genetic polymorphisms, placenta, gene expression.

Los resultados presentados en este trabajo de Tesis Doctoral forman parte de las siguientes publicaciones científicas:

1- Juiz NA, Cayo NM, Burgos M, Salvo ME, Nasser JR, Búa J, Longhi SA, Schijman AG. *Human Polymorphisms in Placentally Expressed Genes and Their Association With Susceptibility to Congenital Trypanosoma cruzi Infection*. J Infect Dis, 2016; 213(8):1299-306.

2- Juiz NA, Solana ME, Acevedo GR, Benatar AF, Ramirez JC, Almeida da Costa P, Macedo AM, Longhi SA, Schijman AG. *Different genotypes of Trypanosoma cruzi produce distinctive placental environment genetic response in chronic experimental infection.* PLoS Negl Trop Dis (bajo revisión PNTD-D-16-01570_R1).

Ambos trabajos se encuentran accesibles siguiendo el enlace:
https://drive.google.com/drive/folders/0B34TNm4sbrGuQ1V3N3BpQVVVUHM?usp=sharing

INTRODUCCIÓN 1
1. Agente etiológico: *Trypanosoma cruzi* 2
1.1. Ciclo de vida 3
1.2. Estructura poblacional 5
2. Vías de transmisión 7
2.1. Transmisión vectorial 7
2.2. Transmisión vertical 8
2.3. Transmisión transfusional 9
2.4. Transmisión por trasplante de órganos 10
2.5. Transmisión oral 10
3. Etapas de la infección 10
4. Tratamiento etiológico 12
5. Diagnóstico de la infección 13
6. Infección congénita de *T. cruzi* 14
6.1. Implicancias de la transmisión vertical 14
6.2. Factores de riesgo de transmisión vertical 15
6.2.1. Carga parasitaria materna 16
6.2.2. Variabilidad genética de *T. cruzi.* 17
6.2.3. Respuesta inmune materna 18
6.2.4. Respuesta inmune fetal. 19
6.2.5. Factores placentarios. 19
6.3. Mecanismos de transmisión vertical de *T. cruzi* 20
7. Cardiopatía Chagásica Crónica 23
8. Aspectos genéticos del hospedero en la Enfermedad de Chagas 25
8.1. Genes candidatos para marcadores genéticos de infección congénita 27
8.1.1. Fosfatasa Alcalina Placentaria. 27
8.1.2. Metaloproteasas. 28
8.1.3. ADAM12. 29
8.2. Genes candidatos para marcadores genéticos de CChC 29
OBJETIVO GENERAL 31
OBJETIVOS ESPECÍFICOS 31
MATERIALES y MÉTODOS 34

1. Materiales 33
1.1. Soluciones y tampones de uso general 33
1.2. Reactivos 34
1.2.1. Marcadores de peso molecular 34
1.2.2. Enzimas. 34
1.2.3. Equipos comerciales para la purificación de ADN 34
2. Áreas de trabajo 35
3. Métodos 36
3.1. Recolección de muestras 36
3.1.1. Muestras murinas 36
3.1.1.1. Infección y grupos de estudio. 36
3.1.1.2. Apareamientos, sacrificio y toma de muestras. 37
3.1.2. Muestras humanas 37
3.1.2.1. Muestras de niños y recién nacidos de madres seropositivas para Chagas. 37
3.1.2.2. Muestras de adultos con serología positiva para Chagas. 38
3.2. Extracción de ácidos nucleicos 39
3.2.1. Extracción de ADN. 39
3.2.2. Extracción de ARN. 40
3.3. Digestión con enzimas de restricción 41
3.3.1. Distancias genéticas de Jaccard. 41
3.4. Obtención de ADN copia 41
3.4.1. Tratamiento con ADNasa. 41
3.4.2. Síntesis de ADN copia. 42
3.5. Selección de genes candidatos y polimorfismos 42
3.6. Diseño de oligonucleótidos cebadores 42
3.7. Visualización y cuantificación de ácidos nucleicos y proteínas 43
3.7.1. Cuantificación y medida de pureza. 43
3.7.2. Geles de agarosa. 43
3.7.3. Geles de poliacrilamida. 43
3.7.4. Western blot. 44
3.8. Detección y cuantificación de *T. cruzi* 45

3.8.1. PCR en tiempo real con sondas TaqMan a partir de ADN. 45
3.8.2. PCR en tiempo real a partir de ADN copia. 45
3.8.3. PCR anidada para determinación de microsatélites. 46
3.9. Genotipificación de muestras humanas 47
3.9.1. Genotipificación de genes de expresión placentaria. 47
3.9.1.1. Análisis de Curvas de Disociación de Alta Resolución (HRMA). 47
3.9.1.2. Electroforesis capilar para identificación de microsatélites 50
3.9.2. Genotipificación de *CCR2* y *CCR5* con sondas TaqMan®. 50
3.10. Expresión génica en muestras placentarias 52
3.10.1. Microarreglo en muestras de placentas de ratones. 52
3.10.2. PCRs en tiempo real para evaluar expresión génica. 52
3.11. Análisis de datos 54
3.12.1. Asociación de polimorfismos y fenotipo 54
3.12.2. Análisis de los datos del microarreglo. 55
3.12.3. Análisis estadísticos de variables cuantitativas. 57
RESULTADOS 58
R 1. Expresión génica en el microambiente placentario en modelo experimental de infección crónica con distintos genotipos de *T. cruzi* 59
1. Microarreglo para identificación de genes diferencialmente expresados 60
1.1. Análisis jerárquico de agrupamiento en las muestras de estudio 60
1.2. Genes diferencialmente expresados 61
1.3. Análisis de Sobre-Representación 63
1.4. Análisis de Clase Funcional por Puntuación 67
1.5. Validación del Microarreglo 72
1.5.1. Validación a nivel de ARNm por RT-qPCR. 72
1.5.2. Validación del Microarreglo por Western Blot. 76
2. Análisis histopatológicos 77
3. Estudios parasitológicos 79
3.1. Cuantificación relativa de ADN satélite de *T. cruzi* en el binomio materno-fetal y en tejido placentario 79
3.2. Análisis de la viabilidad de *T.cruzi* en placenta 81
3.2.1. Diseño de oligonucleótidos. 81

3.2.2. Optimización de las condiciones de ciclado. 82
3.2.3. Elaboración de curvas de cuantificación. 83
3.2.4. Cuantificación relativa de ARNr 18S de *T.cruzi* en placenta de ratón. 84
3.3. Caracterización de poblaciones parasitarias 85
3.3.1. PCR-RFLP 85
3.3.2. Microsatélites 86
R2. Genes candidatos para marcadores genéticos de infección congénita de *T. cruzi* 88
1. Selección de genes y polimorfismos 89
2. Genotipificación 90
2.1. Diseño de técnicas de amplificación por PCR 91
2.2. Análisis de Curvas de Alta Resolución 91
2.3. Electroforesis Capilar 95
3. Análisis de asociación de polimorfismos y la infección congénita 97
3.1. Distribución de frecuencias genotípicas y alélicas 97
3.2. Análisis de interacción gen-gen 101
3.3. Análisis de Haplotipo en la región de *MMP2* 104
R3. Genes candidatos para marcadores genéticos de Cardiopatía Chagásica Crónica 107
1. Poblaciones de estudio y genotipificación 109
2. Análisis de asociación de polimorfismos y la CChC 111
2.1. Distribución de frecuencias genotípicas y alélicas 111
2.1.1. Población *no wichi*. 111
2.1.2 Población *wichi*. 112
2.2. Análisis de Haplotipos en la región de los genes *CCR2/CCR5* 114
DISCUSIÓN 116
1. Expresión génica en el microambiente placentario en modelo experimental de infección crónica con distintos genotipos de *T. cruzi* 117
1.1. Genotipos de *T. cruzi* y tropismo placentario 117
1.2. Genes de expresión diferencial comunes a ambas cepas de *T. cruzi* 118
1.3. Genes de expresión diferencial entre ambas cepas de *T. cruzi* 120
2. Genes candidatos para marcadores genéticos de infección congénita de *T. cruzi* 122
2.1. Factores Placentarios 122
2.1.1. MMPs. 122

2.1.2. ADAM12. 124
2.1.3. PLAP. 125
2.2. Interacción gen-gen 126
2.3. Técnicas de genotipificación de SNPs 126
3. Genes candidatos para marcadores genéticos de Cardiopatía Chagásica Crónica 127
CONCLUSIÓN 132
PERSPECTIVAS 134
BIBLIOGRAFÍA 135
APÉNDICE 156

INTRODUCCIÓN

La enfermedad de Chagas o tripanosomiasis americana es una antropozoonosis producida por el parásito protozoario *Trypanosoma cruzi*. Su descubrimiento, junto a la identificación y caracterización del patógeno y del vector transmisor, fue realizado en el año 1909 por el médico e investigador brasilero Carlos Chagas (Chagas 1909, 1916). El médico argentino Salvador Mazza describió en 1926 la magnitud de la endemia en Argentina, Bolivia y Paraguay. Es una enfermedad crónica debilitante que afecta la salud y el bienestar de un gran número de seres humanos. Está íntimamente relacionada al desarrollo socio-económico de la población, constituyendo la enfermedad parasitaria principal del continente americano y representando uno de los problemas de salud pública más importantes de Latinomérica. De acuerdo con las estimaciones basadas en los datos del año 2010, 5.742.167 de personas están infectadas con *T. cruzi* en esta región, de los cuales 1.505.235 pertenecen a nuestro país. Además, Argentina presenta el mayor número de casos de cardiopatía de la región, con 376.309 afectados, y se estima que habrá 1.078 casos nuevos por año debido a transmisión vectorial y 1.457 por transmisión congénita (OMS, 2015).

1. Agente etiológico: *Trypanosoma cruzi*

El agente etiológico de la enfermedad de Chagas es el *Trypanosoma cruzi*. Este parásito pertenece al orden de los kinetoplástidos, un grupo ampliamente distribuido de protozoos que poseen uno o dos flagelos. Conforman un grupo monofilético que divergió tempranamente de la rama común a los organismos eucariotas. La característica morfológica que los distingue es una estructura prominente y paraflagelar conocida como cinetoplasto, que corresponde a una condensación de ADN (ADNk), localizado en el interior de una única mitocondria que está ramificada por toda la célula. Dentro de la familia Trypanosomatidae, el género Trypanosoma es uno de los más importantes por incluir una serie de especies que ocasionan enfermedades en humanos, como *T. cruzi*, *T. brucei gambiense* y *T. brucei rhodesiense*, agentes causales de la enfermedad de Chagas y del sueño, respectivamente; y *T. brucei brucei*, *T. equiperdum*, *T. evansi* y *T. equinum*, causantes de enfermedades en animales.

1.1. Ciclo de vida

Trypanosoma cruzi presenta un ciclo de vida complejo, en el que intervienen dos hospedadores, uno mamífero y otro, un insecto triatomíneo, comúnmente denominado vinchuca. Para poder adaptarse a los diferentes microambientes de sus hospedadores, el parásito experimenta transformaciones biológicas, que se reflejan en cambios metabólicos y estructurales (Tabla I1). Así, *T. cruzi* posee tres formas morfológicas diferentes:

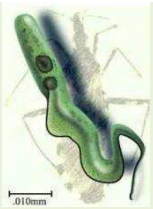
La forma **epimastigote** es elongada (20 - 40 x 2µm) con el origen del flagelo próximo y por delante del núcleo. Este estadio se desarrolla en el vector y en cultivos axénicos, y constituye una de las formas proliferativas del *T. cruzi.*	
	La forma **tripomastigote** es elongada (20 x 25 µm) con el cinetoplasto situado por detrás del núcleo; el flagelo nace en su proximidad y emerge por un costado del cuerpo, se libera por el extremo anterior creando la imagen de una membrana ondulante de importante extensión. Es la forma infectiva sin capacidad replicativa. Está presente en el sistema circulatorio en el mamífero (tripomastigote circulante) y en la ampolla rectal del vector (tripomastigote metacíclico). En cultivo de células y en el espacio intracelular del hospedador vertebrado, carece de capacidad replicativa.
Por último, la forma **amastigote** es esférica u ovalada (2 - 4µm) y carece de flagelo libre. Es el estadio de localización intracelular y replicativo en el mamífero.	

Tabla I1. Morfología de *T. cruzi.*

El ciclo biológico de *T. cruzi* en el hospedador invertebrado se inicia cuando la sangre de un animal infectado es succionada por el insecto ingiriendo, de esta manera, los parásitos en su forma tripomastigote circulante (Figura I1). Al llegar al estómago, los mismos se transforman a esferomastigotes y epimastigotes (forma replicativa). Luego los parásitos migran hacia el intestino donde se multiplican como formas epimastigote (25 horas después de la infección). Por último, en el tubo digestivo ocurre la transformación hacia la forma tripomastigote metacíclico (forma infectiva).

En el hospedero vertebrado, el ciclo comienza cuando las formas tripomastigotes metacíclicos y epimastigotes son eliminadas en las heces y orina del insecto vector y son inoculadas en la piel o mucosas del vertebrado (Figura I1). Los tripanosomas son incapaces de atravesar la piel intacta pero entran en el organismo a través de excoriaciones de la piel, o a través de las mucosas, invadiendo inmediatamente las células hospederas. Las formas tripomastigotes pueden infectar una amplia variedad de células (macrófagos, células musculares lisas y estriadas, células de Schwann, fibroblastos, de la glia y neuronas) excepto eosinófilos y neutrófilos.

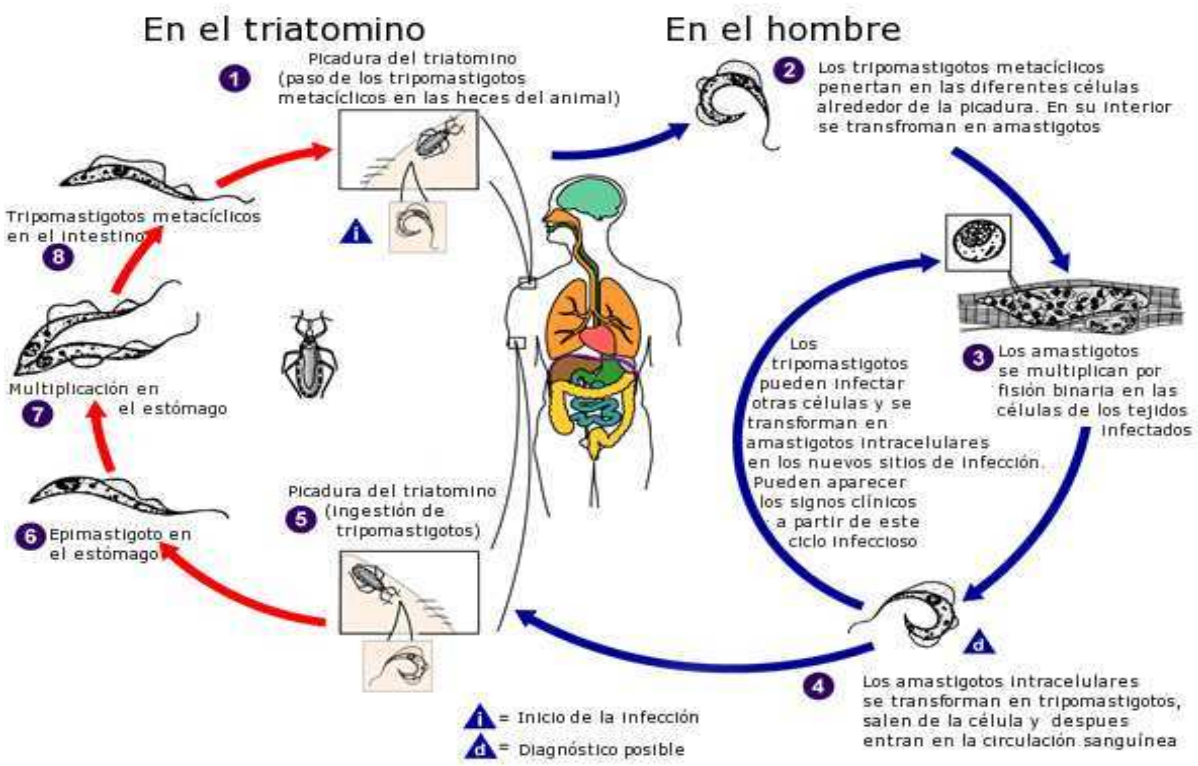


Figura I1. Ciclo de las distintas formas de *Trypanosoma cruzi* tanto en el hombre (flechas azules) como en los insectos triatominos, como la vinchuca y el chito (flechas rojas). Fuente: adaptado del CDC, 2012.

Después de ingresar a la célula, las formas tripomastigotes pueden ser encontradas en el interior de una vacuola parasitófora. Un tiempo después se transforman en amastigotes (forma replicativa en el mamífero) en el citoplasma de la célula hospedera. Unas 35 horas después de la infección se inicia el proceso de división celular binaria que prosigue por varios días dependiendo de la cepa de *T. cruzi* y de la célula hospedera. El tiempo de replicación es de aproximadamente 14 horas. Cinco días más tarde, cuando la célula hospedera contiene alrededor de 500 amastigotes, se inicia

un proceso prácticamente sincronizado de transformación a la forma tripomastigote. Junto con el crecimiento del flagelo, los tripomastigotes comienzan un movimiento intenso que parece ser el responsable de la ruptura de la célula hospedera y la subsiguiente liberación al espacio intercelular. Esta nueva generación tiene la capacidad de invadir otras células en el mismo sitio donde fueron liberadas o salir al torrente circulatorio y distribuirse por todo el organismo. El ciclo de vida se cierra cuando un triatomino se alimenta de un reservorio mamífero con tripanosomas circulando.

1.2. Estructura poblacional

Trypanosoma cruzi es una especie compuesta por poblaciones heterogéneas, a veces muy diferentes en su constitución, que circulan por la naturaleza entre el hombre, vectores, animales domésticos y reservorios salvajes (Fernandes y col., 1997). Actualmente hay consenso en que *T. cruzi* conforma un patrón paradigmático de evolución clonal con baja tasa de recombinación genética (Tibayrenc y col., 1991; Tibayrenc y Ayala, 2002; Sturm y Campbell, 2010). El modelo propuesto no implica ausencia absoluta de recombinación genética, sino una frecuencia muy baja que no altera significativamente la propagación uniparental del parásito (aspecto en debate). Esto presupone que los clones son estables en el tiempo y espacio, permitiendo estudiarlos como marcadores epidemiológicos. La gran variabilidad puede verse reflejada en sus morfologías, enzimas específicas (Miles y col., 1978), patrones de infectividad y patogenicidad (Mortara y col., 2005; Burgos y col., 2010), susceptibilidad a agentes quimioterapéuticos (Brener y col., 1976; Murta y Romanha, 1998), propiedades inmunológicas (Di Noia y col., 2002), tropismo tisular en animales de experimentación (Andrade, 1982; Andrade, 1999), así como también en su distribución geográfica (Figura I2).

Históricamente, el estudio de la diversidad genética de *T. cruzi* se ha visto obstaculizada por la falta de métodos estandarizados de tipificación y por el uso de varias nomenclaturas distintas. En el año 2009, teniendo en cuenta los estudios filogenéticos más recientes y con el objetivo de consensuar la nomenclatura, en una reunión satélite realizada en Buzios, Brasil: "Second Satellite Meeting" (Zingales y col., 2009) se acordó un consenso para la clasificación de la cepas de *T. cruzi* en 6 unidades discretas de

tipificación (UDTs), las cuales abarcan de la TcI a TcVI. Recientemente, un grupo de aislamientos del parásito en murciélagos exhibió una combinación de genotipos distinta a las existentes en las 6 UDTs descriptas hasta el momento, indicando la existencia de un grupo evolutivo distinto, denominado TcBat, más cercano genéticamente a TcI, pero claramente segregado del resto de las UDTs (Marcili y col., 2009; Pinto y col., 2012).

Se han utilizado gran cantidad de métodos para caracterizar la estructura poblacional de *T. cruzi* entre ellos ensayos bioquímicos y marcadores genéticos. Dentro de los primeros está el análisis de variantes electroforéticas de isoenzimas (MLEE, del inglés *Multi-Locus Enzyme Electrophoresis*) que ha permitido clasificar a *T. cruzi* en 3 grupos o zimodemas (Z1, Z2 y Z3; Miles y col., 1978). En cuanto a los genéticos, se han descripto distintos algoritmos utilizando la Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR) (Burgos y col. 2007, Cura y col., 2015). Actualmente, como estándar de oro de los estudios poblacionales se ha propuesto el MSL (del inglés *Multi-Locus sequence typing*), que proporciona datos reproducibles y transferibles (Zingales y col., 2012).

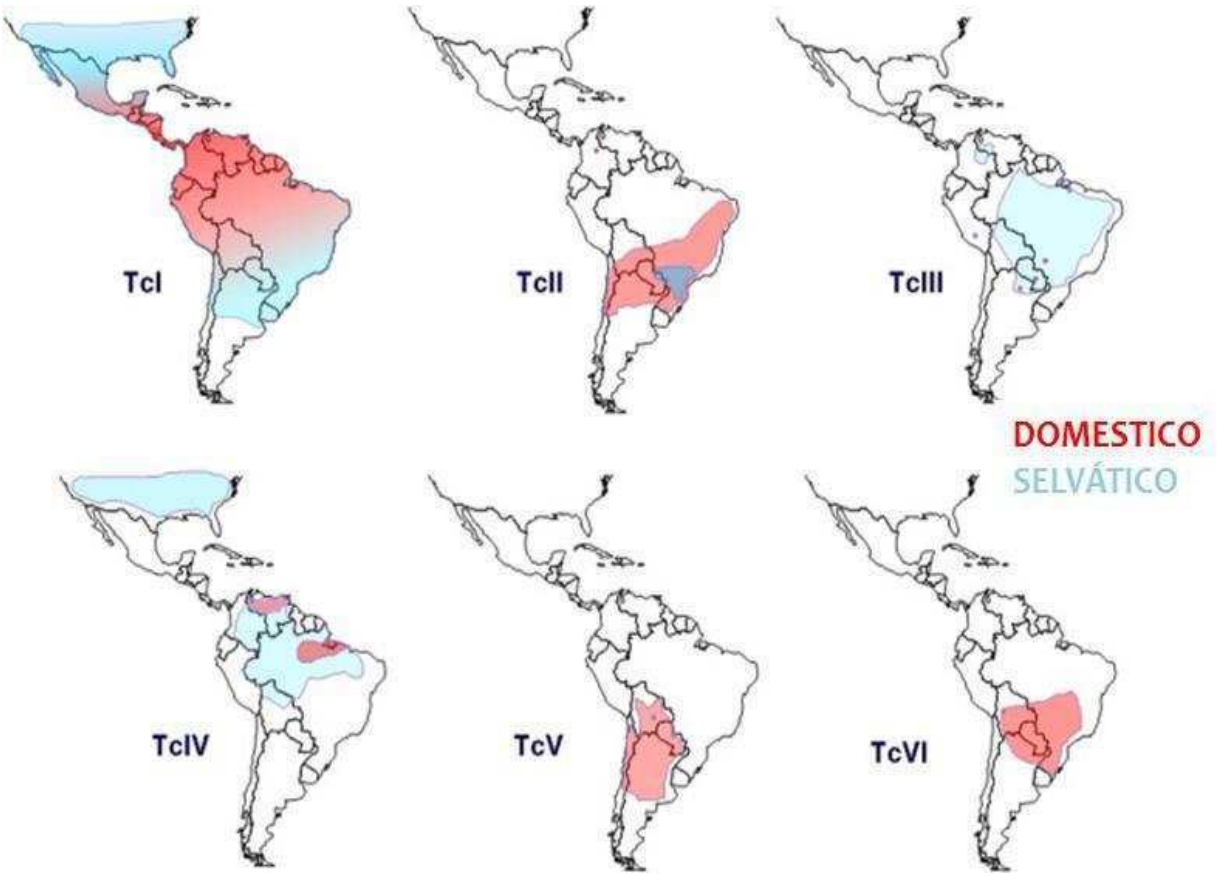


Figura I2. Distribución de las diferentes UDTs en América. Adaptada de Zingales y col. (2012).

2. Vías de transmisión

Existen diferentes vías de transmisión de la infección por *T. cruzi*. Sus incidencias y prevalencias varían según las regiones geográficas, la endemicidad de la infección y los diferentes controles que se aplican sobre cada una de ellas. Las acciones del hombre sobre el ambiente, su condición de vida y vivienda, y los fenómenos de migración hacia los centros urbanos, han originado una gran heterogeneidad en la epidemiología de la infección. En los últimos años, se han realizado grandes esfuerzos para tomar medidas de control del vector y para mejorar la seguridad de las transfusiones sanguíneas en zonas endémicas. A causa de ello, otras formas de transmisión, como la oral, congénita y por trasplante de órganos, han cobrado mayor importancia.

2.1. Transmisión vectorial

Históricamente, la transmisión vectorial es la vía más importante en zonas endémicas. En esta vía, los parásitos presentes en las heces del insecto hematófago penetran por la herida que causa la picadura, por lesiones en la piel o por las mucosas de ojos, boca o nariz. Los insectos que pueden infectarse, y por lo tanto, pueden transmitir la enfermedad, pertenecen a la familia Reduviidae, subfamilia Triatominae (más de 130 especies, entre las que se encuentran los géneros Triatoma, Rhodnius y Panstrongylus). *Triatoma infestans*, el principal vector domiciliario, ha sido eliminado en Uruguay, Chile, Brasil, y en varias regiones de Argentina y Paraguay (Dias y col., 2002). Sin embargo, han surgido especies de vectores peridomésticos y domésticos secundarias, e incluso poblaciones con resistencia a insecticidas (Picollo y col., 2005; Cecere y col., 2006). Los focos de hiperendemicidad persistente en el Gran Chaco y Bolivia parecen ser consecuencia de la alta tasa inicial de infección, del hábitat de la población, de la baja eficiencia de los insecticidas en los climas tropicales, de la precariedad de las viviendas rurales, y de la falta de políticas locales de sostenibilidad (Gürtler y col., 2007), que derivan en una inadecuada vigilancia de vectores y cobertura de insecticidas.

Se pueden distinguir tres ciclos de transmisión de *T. cruzi* con intervención del vector. El **ciclo silvestre**, o primitivo, es de naturaleza zoonótica. El protozoario circula entre los insectos vectores y los reservorios silvestres (mamíferos de pequeño y mediano porte). Se han descripto más de 100 reservorios silvestres de *T. cruzi* entre marsupiales,

xenartros, murciélagos, carnívoros, lagomorfos, roedores y primates no humanos (Coura y Pinto Dias, 2009). Los ecótopos primitivos de *T. cruzi* son muy diversos, encontrándose en los desiertos norteamericanos, los altiplanos andinos y las selvas amazónica y atlántica. La tripanosomiasis silvestre prefiere ambientes ecológicamente cerrados o semiabiertos, variando en los hospederos y vectores, dependiendo de factores como el clima, altitud, humedad, características fauno- florísticas y disponibilidad de alimentos.

El **ciclo doméstico** comprende la infección del hombre y la consecuente enfermedad de Chagas. Esta situación es mucho más reciente en el contexto histórico y está definida por factores antroponóticos, haciendo del hombre uno de los últimos reservorios naturales de *T. cruzi*.

El **ciclo peridoméstico** comprende a mamíferos (roedores domésticos, marsupiales, gatos, perros), que habitan el peridomicilio y que están en contacto cercano con el hombre y sus residencias; y a triatomas silvestres, que son atraídos por el alimento y las luces de las viviendas. Estos ciclos no ocurren necesariamente aislados uno del otro sino que, según las características eco-epidemiológicas de cada lugar, se pueden superponer con distinta frecuencia. Esta superposición ocurre, por ejemplo, cuando el hombre incursiona en regiones donde la transmisión es fundamentalmente enzoónotica, o por la invasión ocasional de vectores silvestres a los domicilios.

2.2. Transmisión vertical

La transmisión vertical, también conocida como connatal o congénita, se refiere a la transmisión de una generación a la siguiente, incluyendo la transmisión prenatal, perinatal y posnatal de parásitos vivos. Según la última estimación de la OMS (WHO, 2015), 1.125.000 mujeres en edad fértil están infectadas con *T. cruzi* en Latinoamérica, con una incidencia de 8.668 casos por año, con el 50% de los casos agrupados en México, Argentina y Colombia. A pesar de que se pueden observar diferencias entre países, la transmisión materno-fetal ocurre en un promedio del 5% de las madres infectadas en las áreas endémicas (Howard y col., 2014).

La transmisión congénita de *T. cruzi*, a diferencia de la toxoplasmosis, puede ocurrir tanto en la fase aguda como en la crónica de la infección materna incluso mucho

después de que una mujer ha emigrado a una región no endémica (Carlier y col., 2011). Sin embargo, la mayoría de los casos derivan de madres que cursan la etapa crónica de la enfermedad, habiendo sido infectadas por el insecto vector durante la niñez por residir en áreas endémicas de Latinoamérica (Carlier y Truyens, 2010). Puede repetirse en embarazos subsiguientes (Bittencourt, 1992) y durante todo el período fértil de una mujer (Carlier y Torrico, 2003), así como también puede ocurrir transmisión transgeneracional (vertical) de parásitos por la transmisión de una mujer infectada a su hija, quien a su vez transmite los parásitos a sus propios hijos. Por lo cual esta vía toma particular importancia como mecanismo de urbanización de la infección. De hecho, se han reportado casos de infección congénita actualmente en EE.UU., Europa (principalmente España) y Japón (Basile y col., 2011; Imai y col, 2014).

Epidemiológicamente, la vía vertical de infección se define cuando un neonato ha nacido de madre infectada y i) se detectan parásitos al nacimiento o ii) se detectan parásitos o anticuerpos específicos de origen no materno luego del nacimiento y la transmisión previa por vía vectorial o tranfusional pueden ser descartadas (Carlier y col., 2011). No se conocen mecanismos específicos ni directos para prevenir la transmisión vertical. Varios autores recomiendan el tratamiento de las niñas menores de 15 años y mujeres en edad fértil fuera del período de amamantamiento como modo de prevención de la transmisión congénita (Sosa-Estani y col., 2009; Carlier y col., 2011). Aunque hay una asociación entre la carga parasitaria circulante, las drogas parasiticidas actualmente disponibles se consideran contraindicadas en el embarazo debido a la falta de datos disponibles sobre su seguridad en el embarazo y para el feto (OMS, 1995; Carlier y col., 2011). Esto determina la aparición permanente de nuevos casos de Chagas Congénito (Gürtler y col., 2003; Brutus y col., 2010).

2.3. Transmisión transfusional

La seguridad en las transfusiones de sangre parece ser adecuada en la mayor parte de los países de Latinoamérica, a excepción de Bolivia y México, con una cobertura de 99% en el tamizado de sangre (Schmunis y Cruz, 2005). Sin embargo, la infección transfusional se ha convertido en una seria complicación en los países no endémicos. Debido a la migración de pobladores infectados provenientes de regiones endémicas, se

han informado 11 casos de transfusión en países desarrollados donde es prioritario implementar un tamizaje apropiado (Gascón y col., 2010; Lescure y col., 2010; Benjamin y col., 2012). En todos los casos, la población de riesgo está constituida principalmente por los individuos poli-transfundidos (pacientes hemofílicos y sometidos a diálisis).

2.4. Transmisión por trasplante de órganos

Se ha reportado la transmisión de la infección a receptores seronegativos en trasplantes de hígado, páncreas y riñón, con tasas de transmisión variables que alcanzan el 35% (Barcan y col., 2005). Por lo que en áreas endémicas es obligatorio el control serológico del donante y el receptor. Estos casos, al igual que los pacientes infectados con *T. cruzi* que deben recibir un trasplante, presentan una problemática particular debido a la inmunosupresión post-trasplante del receptor. Estos pacientes deben ser monitorizados y en aquellos en los que se detectan parásitos en sangre en muestras consecutivas, chagomas en la piel o nidos de amastigotes en muestras de biopsias, es recomendable que el paciente sea medicado con drogas anti-parasitarias (Diez y col., 2007). Recientemente, la estandarización de métodos moleculares permitió su utilización para la detección temprana de casos de reactivación o de infección aguda por transplante (Burgos y col., 2010; Cura y col., 2013).

2.5. Transmisión oral

Se considera que la vía de transmisión oral es causante de la enfermedad de Chagas cuando se presenta más de 1 caso agudo de enfermedad febril vinculada a un alimento sospechoso sin otra causa. Debe ser confirmada por la presencia del parásito después de un examen microscópico o de PCR directo de la muestra de sangre u otros fluidos biológicos del paciente (Shikanai-Yasuda y Carvalho, 2012; Blanchet y col., 2014; Noya y col., 2015).

3. Etapas de la infección

La enfermedad presenta tres períodos bien definidos: fase aguda, fase crónica asintomática, y fase crónica con manifestaciones cardíacas o digestivas. El período de incubación en la fase aguda es de 4 a 10 días, y de menor duración cuando la vía de transmisión es transfusional. El **período agudo**, caracterizado por la presencia de una

elevada parasitemia, se extiende durante dos a cuatro meses. Es de curso habitualmente benigno en pacientes inmunocompetentes, con una tasa de letalidad del 2 al 7%. Solo el 1 o 2% de los casos de enfermedad de Chagas se detectan en esta etapa. Este período es generalmente asintomático, o puede presentarse con manifestaciones sistémicas comunes a otras enfermedades como fiebre, edema, adenopatías satélites, hepatomegalia y esplenomegalia. La fiebre es frecuente, irregular, pero puede ser continua y alta. Se acompaña de anorexia, astenia, mialgias, cefalea y, ocasionalmente, artralgias. El cuadro febril suele persistir por un período de dos a cuatro semanas. En algunos casos, se observan signos de puerta de entrada o chagomas de inoculación, lesiones cutáneas que son más frecuentes en rostro y extremidades. Un signo típico es el que se observa en la región ocular, llamado signo de Romaña-Mazza. Los chagomas pueden presentarse en cualquier parte de la piel, con aspecto furunculoideo, de color rosado o violáceo, e indurados. En general, las manifestaciones clínicas de la etapa aguda son más frecuentemente observadas en niños, donde el desarrollo de miocarditis aguda llega a ser mortal en un 5% de los casos. Algunos pacientes presentan compromiso meningo-encefálico. En esta fase, las formas tripomastigotes son fácilmente detectadas en sangre debido a la elevada parasitemia.

Superada la fase aguda, los individuos infectados transitan por un **período crónico** sin sintomatología clínica, caracterizado por una baja parasitemia y por la presencia de anticuerpos del tipo IgG anti-antígenos de *T. cruzi*. Aproximadamente, un 70% de los pacientes permanece asintomático durante toda su vida, con exámenes de electrocardiograma y radiografías normales. El resto de los pacientes puede, en un lapso de 10 a 30 años, evolucionar a una forma crónica con manifestaciones clínicas. Las principales manifestaciones son la cardiopatía y los megasíndromes digestivos, que pueden ocurrir separadamente o coexistir en un mismo paciente. Las bajas parasitemias persisten, acompañadas de títulos elevados de anticuerpos (si el paciente es inmunocompetente). Este período se caracteriza por su evolución lenta (generalmente entre 10 y 20 años) y por el predominio de daño tisular. Las manifestaciones digestivas involucran a un tercio de los pacientes con manifestaciones clínicas y consisten en la dilatación de vísceras (principalmente colon y esófago) debido a disfunciones neuronales ocasionadas por el parásito. Por otro lado, en dos tercios de los enfermos, la progresiva

miocarditis lleva al desarrollo de la Cardiopatía Chagásica crónica (CChC). En Argentina, así como en Venezuela y Centro América, la manifestación clínica principal es la miocardiopatía. Por el contrario, en Chile y en la región central de Brasil predominan los megasíndromes (Luquetti y col., 1986; Dias, 1989). Esta incidencia heterogénea de las manifestaciones en las distintas áreas endémicas podría obedecer tanto a diferencias biológicas y genéticas de los parásitos circulantes (Macedo y col., 2004) como a factores relacionados con el hospedero (edad, género, etnia, exposición a reinfecciones, historia familiar de cardiopatía Chagásica, etc.) (Zicker y col., 1990; Pereira y col., 1992; Araujo y col., 2007).

4. Tratamiento etiológico

Las drogas disponibles para el tratamiento de la enfermedad de Chagas son el Benznidazol y el Nifurtimox. El éxito terapéutico se encuentra íntimamente relacionado a la etapa de la infección que cursa el paciente al momento de iniciar el tratamiento. Tanto los individuos en fase aguda (independientemente de la vía de infección), como los neonatos y niños, tienen un mejor pronóstico terapéutico (Freilij y Altcheh, 1995; Blanco y col., 2000; OMS, 2007). Por otro lado, en los individuos con infección crónica, el éxito de dichas drogas es discutido, y se carece de un régimen terapéutico establecido (Viotti y Vigliano, 2007). En 2015, un estudio realizado bajo el marco del ensayo BENEFIT (del inglés *Benznidazole Evaluation for Interrupting Trypanosomiasis*) ha demostrado que el tratamiento tripanocida con benznidazol en pacientes con CChC redujo significativamente la detección de parásitos en circulación sanguínea, pero no así el deterioro cardíaco clínico en 5 años de seguimiento (Morillo y col., 2015). En ese mismo año, también surgió la propuesta de un nuevo esquema terapéutico más seguro, con una administración intermitente de benznidazol de la droga (Álvarez y col., 2015).

Entre los pacientes adultos los efectos adversos son mucho más importantes, presentándose casos de fotosensibilidad y erupciones en la piel, náuseas, anorexia, pérdida de peso y dolores abdominales. Actualmente existen distintas iniciativas de nuevas drogas terapéuticas como son los ensayos de E1224 (Buckner y col., 2012) y Chagasazol (Molina y col., 2014).

5. Diagnóstico de la infección

En la fase aguda, la infección se diagnostica por un examen físico con hallazgos referentes a los síndromes de entrada, edema, fiebre, hepatoesplenomegalia, adenopatías, taquicardia, arritmias o signos de insuficiencia cardíaca. Dado que la parasitemia es elevada, los métodos parasitológicos presentan gran sensibilidad en esta etapa. De igual forma, estos métodos son utilizados para el diagnóstico de la infección congénita en neonatos y en niños menores de 6 meses. La falta de maduración del sistema inmune y la presencia de anticuerpos IgG maternos imposibilitan, en estos últimos, la utilización de la serología para el diagnóstico de la infección. Así mismo, los métodos parasitológicos son utilizados para el diagnóstico de reactivaciones en pacientes inmunosuprimidos, en los que también se evidencia parasitemias elevadas.

Las técnicas parasitológicas se basan en la búsqueda del parásito en las muestras sanguíneas. Existen técnicas directas basadas en el diagnóstico morfológico de *T. cruzi*, a través de la examinación microscópica del parásito. Entre ellos se destacan el examen de Strout, el microhematocrito (Freilij y col., 1983) o micrométodo, el examen en fresco y el de gota gruesa. Las técnicas indirectas permiten la detección del parásito luego de su amplificación, como son el xenodiagnóstico, basado en la amplificación del parásito dentro de ninfas de triatominos no infectados alimentadas con sangre del paciente (Portela-Lindoso, 2003); hemocultivo, que consiste en cultivar muestras de sangre del paciente (Chiari, 1989); inoculación en animales sensibles, que se utiliza principalmente para aislar cepas del parásito inoculando ratones o cobayos con sangre del paciente tratada con anticoagulantes (Pifano y col., 1954); y por último, los métodos moleculares como la PCR y el LAMP (del inglés, *loop mediated amplification*) (Thekisoe y cols., 2010).

En la fase crónica asintomática, por el contrario, la serología reactiva contra *T. cruzi* es considerada la técnica de referencia para el diagnóstico. Las técnicas parasitológicas presentan menor sensibilidad debido a la reducida parasitemia, característica de esta fase de la infección. Los exámenes para la selección de donantes de sangre también utilizan técnicas serológicas. El diagnóstico se realiza por detección de anticuerpos mediante hemaglutinación indirecta (HAI), inmunofluorescencia indirecta (IFI) y ensayo inmuno-adsorbente ligado a enzimas (ELISA). Puesto que ninguna

metodología es determinante *per se*, la OMS ha establecido que es diagnóstico para infección con *T. cruzi* cuando al menos dos de estos métodos son positivos (OMS, 2003).

En todos los casos, el diagnóstico de laboratorio se debe complementar con los antecedentes epidemiológicos y clínicos del paciente, como la procedencia actual y pasada, el tipo de vivienda donde habita, los viajes que pudiera haber realizado a zonas endémicas y los antecedentes de transfusiones sanguíneas y madre infectada.

6. Infección congénita de *T. cruzi*

6.1. Implicancias de la transmisión vertical

En la actualidad, la transmisión vertical de *Trypanosoma cruzi* está tomando mayor relevancia relativa en nuestro país debido a la aplicación de planes de desinsectación que han reducido la transmisión vectorial y a los controles en bancos de sangre que disminuyeron los riesgos transfusionales.

Los efectos producidos por *T. cruzi* en la fertilidad humana son poco conocidos. Un estudio longitudinal en mujeres chilenas mostró valores similares en fertilidad entre mujeres seropositivas y seronegativas (Schenone y col., 1985). En cuanto a estudios experimentales en animales se ha reportado tanto una disminución en ratones (Mjihdi y col., 2002; Id Boufker y col., 2006) pero no en ratas (Shaw y Quadagno, 1975; Davila y col., 1994).

Sólo el 10-30% de los recién nacidos infectados tienen síntomas y de estos, aproximadamente el 10% muere dentro de los 2 días si no son tratados (Torrico y col., 2004). El hecho de que la mayoría de los casos son asintomáticos demanda una búsqueda activa de la infección congénita en los bebés nacidos de madres infectadas o niños en edad escolar mediante diagnóstico de laboratorio. Esto determina que la detección de la infección adquirida por vía transplacentaria se realiza en la adultez, en el transcurso de la fase crónica, por controles médicos de rutina o al aparecer las manifestaciones de la enfermedad (Bittencourt y col., 1988; Freilij y Altcheh, 1995; Burgos y col., 2005).

La gravedad de la infección congénita se correlaciona con la parasitemia materna y neonatal, y con las reinfecciones maternas (Torrico y col., 2006). Se han descripto

abortos espontáneos, nacimientos prematuros, retardo de crecimiento intrauterino, mortinatos y diversas formas clínicas que pueden ir desde bajo peso al nacer, hepatomegalia, esplenomegalia, síntomas respiratorios agudos, anemia, hasta manifestaciones digestivas, cardíacas y compromiso del sistema nervioso central. Estas y otras manifestaciones, con frecuencias diferentes según el área geográfica, han sido ampliamente descriptas (Atias y col., 1962; Freilij y Altcheh, 1995; Barcan y col., 2005; Schijman y col., 2006). El recién nacido sintomático presenta manifestaciones clínicas similares a otras etiologías comúnmente identificadas con el acrónimo TORCH (*Toxoplasma gondii*, virus de la rubeola, cytomegalovirus, y virus del herpes simplex) y por lo tanto también debería considerarse la infección por *T. cruzi* dentro de este diagnóstico diferencial (Carlier y col., 2011).

Asimismo el diagnóstico precoz de la infección congénita es fundamental ya que cuanto menor es el tiempo de evolución de la infección al iniciar el tratamiento más rápida es la seronegativización (Freilij y Altcheh, 1995; Schijman y col., 2003).

6.2. Factores de riesgo de transmisión vertical

La presencia de factores de riesgo se ve evidenciada en la existencia del agrupamiento familiar que presenta la infección congénita (Freilij y Altcheh, 1995; Sanchez Negrette y col., 2005). Este fenómeno se observa en la existencia de madres que transmiten la infección a varios o todos sus hijos, mientras otras mujeres no la transmiten a ninguno.

T. cruzi dentro de distintos organismos hospederos (vertebrado e insecto vector), que constituyen su entorno directo. Por lo tanto, desde un punto de vista ecológico y holístico, la ocurrencia o no de la infección congénita resulta de una compleja interacción entre el parásito y sus hospederos vertebrados, la madre y el feto, ocurriendo en un contexto tan especial como lo es el embarazo. En efecto, una o varias cepas del parásito (cada una de ellas con características específicas) interactúa con:

i) el sistema inmune de la mujer embarazada (cuya respuesta está modulada por factores genéticos y ambientales)

ii) la placenta

iii) el sistema inmune del feto. El rol que juega cada uno de estos factores en la infección congénita, no han sido comprendidos hasta el momento.

6.2.1. Carga parasitaria materna. Existe importante evidencia de que la parasitemia en la mujer embarazada es un factor importante en la transmisión congénita de *T. cruzi*. Aunque la parasitemia tiene un pequeño aumento durante el embarazo (en el segundo y tercer trimestre) (Menezes y col., 1992; Siriano, 2011), la transmisión congénita durante la infección crónica ocurre principalmente en mujeres con 10-20 parásitos por mililitro de sangre, una concentración entre 10-20 veces más alta que las mujeres no transmisoras (Hermann y col., 2004; Virreyra y col., 2007; Salas y col., 2007; Brutus y col., 2010; Bua y col., 2012; Rendell y col., 2015). También existe un aumento en la tasa de transmisión asociado a los años de exposición al vector (Rendell y col., 2015), puesto que en zonas endémicas esta tasa es en promedio de 5%, mientras que en las regiones no-endémicas, donde no existe riesgo de reinfección, disminuye a un 2,7% (Howard y col., 2014).

Un embarazo cursado durante la etapa aguda de la infección tiene mayor riesgo de transmisión vertical que los desarrollados durante la etapa crónica de baja parasitemia (Bittencourt y col., 1988; Moretti y col., 2005; Salas y col., 2007). Lo mismo se ha observado en la co-infección de la madre con el virus de la inmunodeficiencia humana (VIH). El mayor riesgo de transmisión de *T. cruzi* en mujeres con co-infección VIH-*T. cruzi,* en particular en los casos que desarrollan el síndrome de inmunodeficiencia adquirida (Scapellato y col., 2009), podría estar relacionado a las mayores parasitemias que, generalmente, presentan estos pacientes en comparación con pacientes VIH negativos (Sartori y col., 2002; de Freitas y col., 2011). Sin embargo, tanto los estudios con embarazadas en fase aguda de la infección como de embarazadas con co-infección suelen estar constituidos por observaciones puntuales o de pocos casos (Bisio y col., 2013). Por el momento, los análisis más completos se han realizado en mujeres en etapa crónica de la infección.

Resultados similares se han observado en infecciones experimentales, donde las parasitemias de las hembras transmisoras durante una infección aguda son mayores comparadas con las no transmisoras (Cencig y col., 2013).

6.2.2. Variabilidad genética de *T. cruzi*. En la infección congénita humana se han detectado cinco de las seis UDTs (TcI, TcII, TcIII, TcV, y TcVI) como así también co-infecciones. Existe un predominio de la UDT TcV en Bolivia, Argentina, Chile, Paraguay, y el sur del estado brasileño de Rio Grande do Sul, observándose en un 80-100% de los casos (Muñoz y col., 1994; Virreira y col., 2006; Burgos y col., 2007; Virreira y col., 2007; Corrales y col., 2009; del Puerto y col., 2010). Los mismos genotipos detectados en sangre periférica materna, se encuentran en los recién nacidos infectados (Muñoz y col., 1994; Burgos y col., 2007; Virreira y col., 2007; Bisio y col., 2011), y también en los hermanos nacidos con infección congénita en gestaciones consecutivas, lo que sugiere que el embarazo no induce cambios en la población de parásitos predominante (Schijman y col., 2006). Además la distribución de frecuencias genotípicas en los casos congénitos detectados es similar a la observada en la población local infectada (Virreira y col., 2006; Burgos y col., 2007; Corrales y col., 2009). Sin embargo, en infecciones multi-clonales, se observan pequeñas diferencias entre los clones de las madres infectadas y aquellos encontrados en los niños congénitamente infectados, sugiriendo la existencia de una selección natural de la población de parásitos transmitida (Burgos y col., 2007; Ortiz y col., 2012 Llewellyn y col., 2015), quizás por la interacción con las células de la placenta y/o el sistema inmune del hospedero. Se podría hipotetizar que en los casos donde ocurre la transmisión, algunas poblaciones parasitarias maternas más virulentas o con cierto tropismo hacia la placenta (Macedo y Pena 1998, Bisio y col., 2011) logran con mayor éxito que otras alcanzar al feto en crecimiento y establecer la infección.

Experimentos en animales inoculados con parásitos a distintos tiempos antes o durante la gestación observaron ausencia de transmisión materno-fetal o casos aislados de la misma (Andrade, 1982; Carlier y col., 1987; Gonzalez Cappa y col., 1999; Solana y col., 2002; Moreno y col., 2003; Alarcón y col., 2009). Sin embargo, la transmisión si ocurre cuando se bloquea la actividad fagocítica de la placenta o cuando se inducen lesiones placentarias (Werner y Kunert, 1958; Delgado y Santos-Buch, 1978). El trabajo de Solana y col. (2002) con ratones muestra que la cepa RA (TcVI) es transmitida verticalmente con una incidencia del 4% sin producir inflamación uterina, mientras la cepa K98 (TcI) produce infiltración mononuclear en útero, reducción de fertilidad y aumento de reabsorción fetal pero no se transmite verticalmente. Otro trabajo más reciente estudió la transmisión

congénita en ratones con infección aguda y crónica y con distintas cepas de *T. cruzi* X10 (TcI), Y (TcII) y Tulahuen (TcVI), y describió un 4% de transmisión en la infección aguda con las cepas Y y Tulahuen, pero una ausencia de transmisión en X10 e infección crónica (Cencig y col., 2013). Todo esto demuestra una menor transmisión materno-fetal en ratones y ratas que en humanos.

Las capacidades infectivas de las distintas cepas de *T. cruzi* como son la rapidez en invasión y multiplicación en la célula hospedadora (virulencia) y la limitación de la eficacia de la respuesta inmune materna, placentaria y fetal, no han sido marcadores moleculares utilizados para definir los distintos UDTs. La falta actual de evidencias claras de una relación entre el genotipo de *T. cruzi* y la infección congénita, puede deberse al nivel en que se ha estudiado el tema, y amerita más estudios que se enfoquen en los genes relacionados a la infección y a la respuesta inmune generada (Carlier y Truyens, 2015).

6.2.3. Respuesta inmune materna. Las mujeres embarazadas seropositivas presentan mayor producción y niveles más altos de IFN-γ comparando con mujeres seronegativas (Vekemans y col., 2000; Hermann y col., 2004; Cuna y col., 2009). Sin embargo se ha observado que las células de madres transmisoras producen 3 veces menos IFN-γ que aquellas no transmisoras cuando son estimuladas con *T. cruzi*, asociado a una menor activación de células T (Hermann y col., 2004). Por lo tanto, el IFN-γ resulta ser una citoquina fundamental en el control de *T. cruzi*, como de otros patógenos intracelulares. El IFN-γ activa monocitos y macrófagos, aumenta la expresión del receptor para la porcíon Fc de las inmunoglobulinas (esencial para capturar parásitos opsonizados por anticuerpos) y estimula, en sinergismo con TNF-α, la generación de óxido nítrico que elimina a los parásitos (Truyens y Carlier, 2010). Así mismo, las mujeres transmisoras producen menores niveles circulantes de TNF-α y TNFRI soluble, comparando con mujeres no transmisoras, ocurriendo lo mismo con la producción de IL-1β, IL-6 (Vekemans y col., 2000).

Todo esto indicaría que existe una asociación entre una fuerte respuesta inmune y la ausencia de transmisión congénita, que las mujeres que transmiten presentan algún defecto en sus respuestas inmunes innatas y adaptativas, lo cual está relacionado con una menor capacidad de producir IFN-γ en respuesta a *T. cruzi*.

Es importante destacar que la respuesta inmune materna, no solo se ve afectada por factores genéticos, sino también por estados de malnutrición y pobreza (Bittencourt, 1992; Azogue, 1993; Torrico y col., 2004 y 2006), así como también por la microbiota intestinal materna que tendría un rol modulador de la respuesta inmune (Kabat y col., 2014) . Estos son factores a tener en cuenta en las diferencias observadas entre las tasas de transmisión de países endémicos y no endémicos (Howard y col., 2014).

6.2.4. Respuesta inmune fetal. La parasitemia en los recién nacidos suele ser mayor que la materna, aumentando dentro de los tres primeros meses de vida para luego disminuir al entrar en la fase crónica (Bern y col., 2009).

Los recién nacidos infectados tienen una menor proporción de células NK $CD56^{bright}$, afectando la producción de IFN-γ (Hermann y col., 2006), así como también se reportó menores niveles de TNF-α, IFN-γ e IL-18 circulantes (García y col., 2008; Mayer y col., 2010; Fernández-Villegas y col., 2014). Además se demostró que los recién nacidos infectados desarrollan una fuerte respuesta de células T $CD8^+$ específicas contra *T. cruzi*, con actividad citotóxica y producción de IFN-γ pero no de IL-4 (Hermann y col., 2002). También se observó una estimulación de células B, con producción de IgG, IgM e IgA (Reyes y col., 1990; Di Pentima y Edwards, 1999; Rodriguez y col., 2005).

En cambio, los niños no infectados de mujeres infectadas generan un fuerte estado inflamatorio, produciendo mayores niveles de IL-1β, IL-6 y TNF-α en respuesta a *T. cruzi* que aquellos niños de madres no infectadas (Vekemans y col., 2000; Truyens y col., 2005). Por otro lado, sus niveles de activación de células T específicas contra antígenos de *T. cruzi* son bajos o nulos (Eloi-Santos y col., 1989; Neves y col., 1999; Truyens y col. (a), 2005), mientras que la respuesta de células B está más activada, con mayor producción de anticuerpos IgA e IgM. Como la sangre de estos recién nacidos, aparentemente, no estuvo en contacto con parásitos, esta respuesta resultaría de la transmisión de moléculas maternas (Carlier y Truyens, 2015).

6.2.5. Factores placentarios. La placenta es el principal órgano fetal que debe enfrentarse a la presencia del parásito y por lo tanto, la transmisión depende de ella.

Además de las barrera física formada por el sinsiciotrofoblasto, la placenta es un órgano inmunológicamente activo, capaz de iniciar una respuesta inmune, liberando citoquinas y quimioquinas pro-inflamatorias, especies reactivas del oxígeno e intermediarios del nitrógeno y péptidos antimicrobianos, a través de TLRs que reconocen PAMPs (patrones moleculares asociados a patógenos) (Koga y col., 2014).

6.3. Mecanismos de transmisión vertical de *T. cruzi*

La transmisión materno-fetal de parásitos humanos ocurre mayoritariamente por la **vía hematógena transplacentaria** (Figura I3). Esta vía requiere que el parásito cruce y sobreviva, o escape a la barrera trofoblástica (primera línea de defensa placentaria), antes de atravesar el tejido mesenquimático rodeado por vesículas fetales (segunda línea de defensa placentaria), hasta tener acceso a dichas vesículas. Como se muestra en la Figura I3, la ruta hematógena transplacentaria puede ser por: 1) invasión del trofoblasto velloso; 2) de la zona marginal o 3) por rupturas/ desgarros (Carlier y col., 2012).

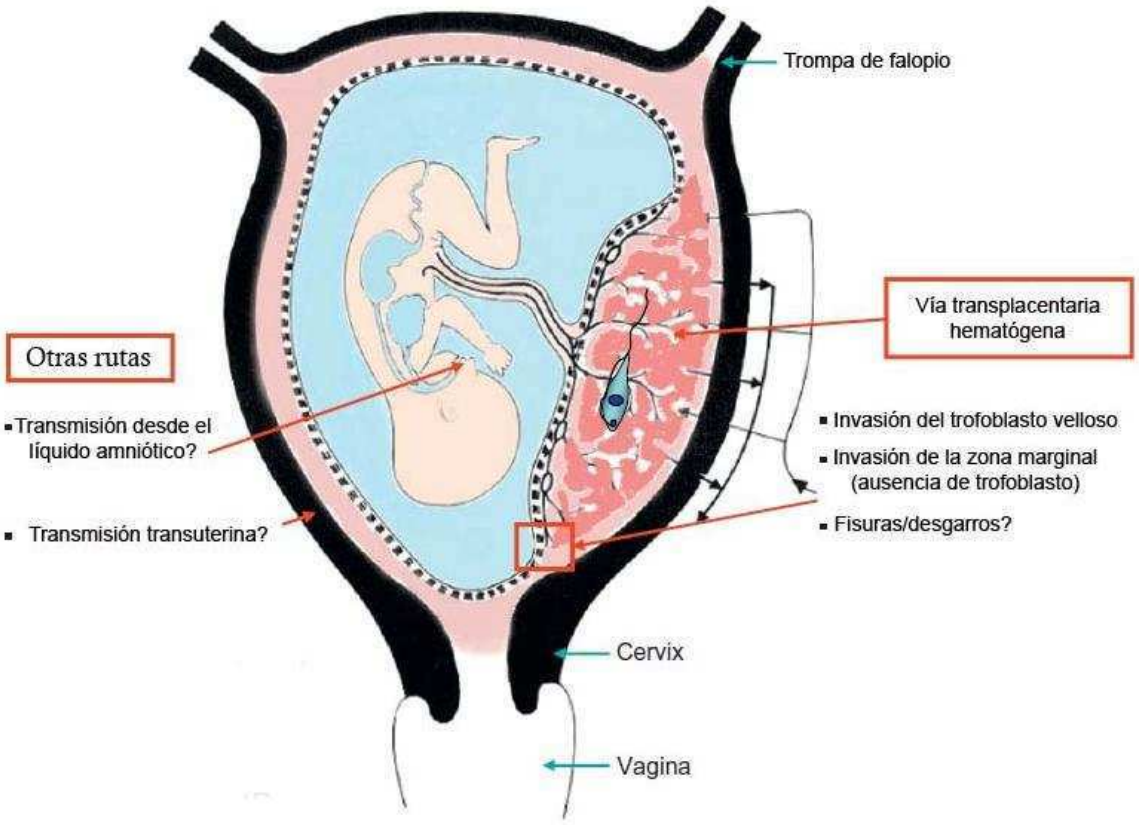


Figura I3. Posibles rutas de la transmisión materno-fetal de parásitos.

Fuente: (Carlier y col., 2010).

1) *Invasión del trofoblasto:* Las vellosidades de la placenta humana están cubiertas por dos capas de trofoblastos, sinsiciotrofoblasto y citotrofoblasto. En gran parte sólo el sinsiciotrofoblasto se interpone entre la sangre materna y los tejidos fetales, previniendo la penetración intercelular (barrera estructural). Se ha observado que *T. cruzi* puede infectar y multiplicarse en las vellosidades placentarias cuando estas son sometidas a grandes cantidades de tripomastigotes *in vitro* (Duaso y col., 2010), mientras que *in vivo* se ha detectado altas parasitemias en placentas de abortos espontáneos (Altemani y col., 2000). Basándose en esta ruta, Kemmerling y col. (2010) proponen el siguiente mecanismo de transmisión congénita de *T. cruzi* (Figura I4):

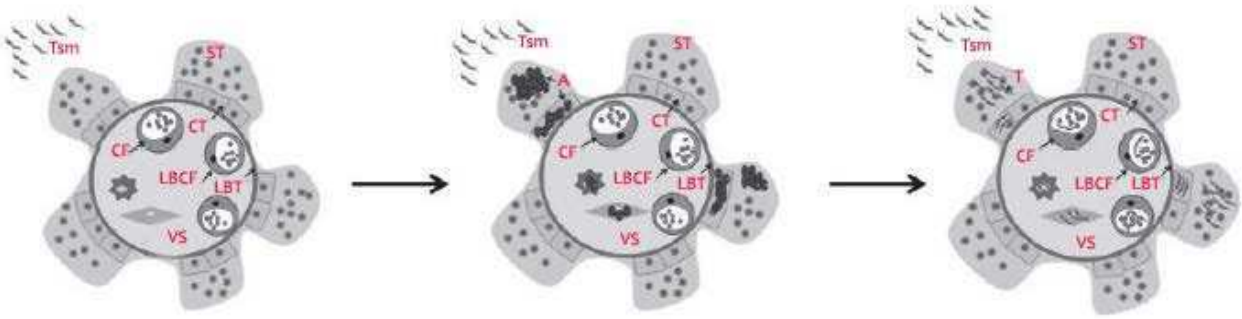


Figura I4. Mecanismo de transmisión congénita de *T. cruzi* propuesto: Durante la transmisión congénita los tripomastigotes de la sangre materna (Tsm) deben cruzar la barrera placentaria. Cuando el tripomastigote se encuentra en el espacio intravelloso infectaría sincisiotrofoblastos (ST), citotrofoblastos (CT) y el estroma velloso (VS), invadiendo diferentes tipos celulares que constituyen estos tejidos. En el interior de estas células y en los sincisiotrofoblastos, los tripomastigotes se diferencian a amastigotes (A), proliferan y después de un cierto número de replicaciones los amastigotes se diferencian a tripomastigotes, que puede invadir los capilares fetales y así infectar el feto. CF: capilar fetal; LBCF: lámina basal del capilar fetal; LBT: lámina basal del trofoblasto. Adaptado de Kemmerling y col., 2010.

Sin embargo, la presencia del parásito en placenta no tendría una estricta correlación con la infección fetal, ya que se observaron casos de infección congénita con y sin nidación placentaria y placentas parasitadas sin infección fetal (Moya y col., 1979; Fernandez-Aguilar y col. 2005). Esto sugiere que el trofoblasto es una de las principales barreras para el pasaje de *T. cruzi* pero que también la transmisión materno-fetal requiere de otras rutas transplacentaria alternativas (Carlier y Truyens, 2010).

2) *Zona marginal de la placenta:* Una de las áreas de la placenta desprovista de trofoblastos es la zona marginal de la placenta que une las membranas a las placas

coriónica y basal, y está constituida por células de músculo liso recubiertas únicamente de epitelio materno (Nanaev y col., 2000).

Esta vía parece ser particularmente importante en la transmisión congénita de *T. cruzi* en madres que presentan enfermedad crónica (etapa en la que se encuentran la mayoría de las madres), ya que comparando secciones seriales de biopsias de placentas de neonatos infectados se ha observado una densidad muy alta de parásitos al nivel de la zona marginal, con un decrecimiento gradual en la placa coriónica y en membranas distantes, en ausencia de invasión de trofoblasto (Fernandez-Aguilar y col., 2005). *T. cruzi* puede infectar y replicar fácilmente en este músculo y en células epiteliales, facilitando la invasión placentaria. Otro modo hipotético de que el parásito atraviese las áreas de la placenta libres de trofoblastos es por la matriz fibrinoide acelular, que reemplaza progresivamente el sincisiotrofoblasto degenerado durante la gestación (Bernischke y col., 2006). No se sabe aún si *T. cruzi*, que expresa receptores de fibronectina (Ouassi y col., 1984 y 1986), usa este mecanismo.

3) *Transmisión parasitaria a través de rupturas/desgarros en la placenta:* Las rupturas y desgarros pueden facilitar la transmisión congénita de parásitos desde la sangre materna. Estas fisuras podrían ser el resultado de daños inducidos por la respuesta inflamatoria placentaria, además de ser aparentemente normal al término de un embarazo, particularmente durante el trabajo de parto (Bernischke y col., 2006). Esta vía comienza a tener importancia dependiendo del número de parásitos en la sangre materna que baña el espacio donde se encuentran las vellosidades cuando se acerca el momento del alumbramiento.

La **vía extra-placentaria** ha sido descripta en algunos trabajos donde observaron la presencia de parásitos en las membranas extra-placentarias coriónica y amniótica y en el líquido amniótico (Moya y col., 1979; Azogue y col., 1985). La posibilidad de una invasión directa placenta/feto a través de la pared uterina (ruta transuterina) no ha sido determinada, aunque se observaron nidos de amastigotas de *T. cruzi* en la decidua de madres que dieron a luz a recién nacidos infectados (Moya y col., 1979). La transmisión en el canal de parto ha sido descripta y asociada a recién nacidos que presentan estudios parasitológicos negativos al nacer pero se tornan positivos semanas más tarde (Blanco y

col., 2000). Y por último, la transmisión posnatal a través de la leche en la lactancia materna es probable, aunque de limitada relevancia epidemiológica (Medina Lopes y col., 1983; Norman y López-Vélez, 2013). Por otro lado, por el importante flujo sanguíneo que irriga a la placenta es difícil descartar que, incluso en casos con pasaje extra-placentario, ocurra simultáneamente la infección transplacentaria.

7. Cardiopatía Chagásica Crónica

La CChC es una cardiopatía dilatada (Figura I5) con infiltrados inflamatorios focales o diseminados, destrucción de músculo cardíaco, fibrosis progresiva y con alta prevalencia de anomalías en la conducción, disfunción de nódulo sinusal, arritmias ventriculares complejas y trombos apicales (Tanowitz y col. 2009). Un signo distintivo de esta patología es el aneurisma apical del ventrículo izquierdo, que se observa en el diagnóstico por imágenes o en la autopsia (Tanowitz y col. 2009; Machado y col. 2012). En el corazón de pacientes con este tipo de cardiopatía, raramente se observan parásitos, aunque sí puede detectarse su ADN por PCR, y se observan infiltrados inflamatorios con predominio de células T, en relación $CD8^+$:$CD4^+$ mayor a 2:1, presencia de macrófagos, y altos niveles locales de TNF-α e IFN-γ (Bonney y col. 2008; Cunha-Neto y col. 2014). En referencia a las alteraciones electrocardiográficas, se detecta bloqueo de rama derecha asociado con un bloqueo de fascículo anterior, así como también extrasístoles ventriculares, alteraciones en la repolarización y taquicardia ventricular (Tanowitz y col. 2009; Machado y col. 2012).

Los síntomas más frecuentes son palpitaciones y disnea de esfuerzo. La evolución de la insuficiencia cardíaca, con arritmias graves y trastornos de conducción, termina, en muchos casos, en muerte súbita. La prevalencia relativa de las distintas manifestaciones clínicas varía según las regiones geográficas (Rassi, 2010).

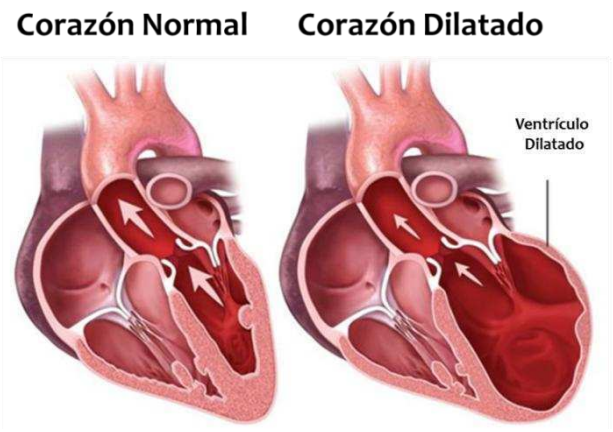


Figura I5. En la miocardiopatía dilatada el miocardio se encuentra debilitado y las cavidades, dilatadas.

Hasta el momento, se desconocen los eventos que desencadenan el pasaje de la etapa crónica asintomática a la CChC. Actualmente, se postulan dos hipótesis para explicar la patología cardíaca: la persistencia del parásito en el tejido cardíaco, y la respuesta inmune desarrollada contra antígenos propios, como consecuencia de la infección por *T. cruzi*.

Sin embargo, hace ya varios años emerge el concepto que postula que la acción directa del parásito así como la respuesta inmune generada en el hospedador, son los principales mecanismos responsables de la patología cardiaca y digestiva. Cunha-Netto y col. (2005) proponen a la desregulación de citoquinas secundarias a la infección por *T. cruzi,* y en especial a la acción de IFN-γ, como responsables de la hipertrofia cardíaca de la CChC. En sangre periférica de pacientes con este tipo de cardiopatía se observó un menor número de células Treg productoras de IL-10, sugiriendo que estas células serían importantes en el control de la inflamación producida en la CChC (Cunha-neto y col. 2014). Por otro lado, los daños por la acción directa del parásito estarían directamente relacionados a la generación de radicales libres debido a alteraciones en el potencial de membrana de mitocondrias de cardiomiocitos que contribuyen a la sintomatología observada en esta fase (Gupta y col. 2009). También se postula que la estimulación sostenida durante años de las células del sistema inmune, genera el agotamiento de células T $CD4^+$ y $CD8^+$, encargadas de un control adecuado de la infección parasitaria (Albareda y col. 2006 y 2009).

Si bien la patología de la CChC es multifactorial, está claro que la presencia de diferentes linajes del parásito, así como los componentes del sistema inmune del hospedador, determinan el progreso de la forma indeterminada de la enfermedad a la cardiopatía crónica (Burgos y col. 2010). Es por eso que el nuevo paradigma actual acepta la persistencia del parásito como un factor importante en el desarrollo de la CChC (Viotti y col. 2014).

8. Aspectos genéticos del hospedero en la Enfermedad de Chagas

La progresión de una infección así como el desarrollo de las diferentes formas clínicas están relacionados con la compleja interacción patógeno/hospedero, que también abarca factores como el estado nutricional, estado inmune previo como, por ejemplo, exposición a otros patógenos, así como también las características genéticas tanto del patógeno como del hospedero.

Los polimorfismos genéticos son variantes del genoma que aparecen por mutaciones en algunos individuos, se transmiten a la descendencia y adquieren cierta frecuencia en la población tras múltiples generaciones (Iniesta y col., 2005). Se considera que una variante alélica es polimórfica cuando la frecuencia de uno de sus alelos en la población es mayor al 1%. La variabilidad fenotípica de cada individuo, puede darse de forma significativa por los polimorfismos de nucleótido simple –SNPs (del inglés *single nucleotide polymorphism*), y en menor grado a insersiones, deleciones, secuencias repetidas y/o re-arreglos cromosómicos, debido a que el genoma humano no es una estructura estática. Los polimorfismos son la base de la evolución y los que se consolidan, bien pueden ser silentes o proporcionar ventajas a los individuos, aunque también pueden contribuir a causar enfermedades (Benhamou y Sarasin, 2002).

En el Proyecto Genoma Humano y en el Proyecto HapMap, se ha estimado que existen aproximadamente 10 millones de SNPs, siendo el tipo de polimorfismo más representado en el genoma humano, y haplotipos comunes de SNPs lo que permite mapeos genéticos más densos, de mayor poder y precisión (Delgado-Vega y Anaya, 2007; The International HapMap Consortium, 2004). Adicionalmente, los SNPs constituyen la mejor opción para la identificación de genes asociados a enfermedades complejas (Thomas y col., 2005), cuya utilidad fue confirmada mediante la tipificación de 11 mil SNPs

en 157 familias del Reino Unido, mostrando mayor contenido de información, uniformidad y definición que los microsatélites (Jonh y col., 2004).

En los últimos años, los estudios de asociación de genomas completos (GWAS) - en la que cientos de miles de SNPs se ponen a prueba para la asociación con una enfermedad en cientos o miles de personas- han sido un abordaje muy utilizado para identificar asociaciones estadísticas entre cientos de loci a lo largo del genoma y rasgos comunes complejos, incluyendo algunas enfermedades como la diabetes tipo 2 (Frayling y col., 2007) y esclerosis múltiple (International Multiple Sclerosis Genetics Consortium, 2007). Sin embargo, este tipo de estudios tiene ciertas dificultades. En primer lugar, se limitan a una mera asociación estadística entre un intervalo genómico y un rasgo complejo. En segundo lugar, la asociación de SNPs identificada en una cierta población frecuentemente no es transferible a individuos de otras poblaciones. Y por último, los estudios GWAS no capturan información de variantes raras y tienen limitaciones estadísticas para detectar pequeñas interacciones gen-gen y gen-ambiente, siendo el mayor inconveniente los costos elevados para realizar este tipo de abordaje.

Otra aproximación para estudiar asociación de variabilidad génica y enfermedades complejas, más viable que los estudios GWAS, es por búsqueda de genes candidatos. Para este tipo de estudio, se tiene que tener conocimientos a priori de la participación de los genes candidatos en la patogénesis del fenotipo de interés. El análisis que comúnmente se realiza es del tipo caso-control o estudios prospectivos de asociación alélica. Es muy importante replicar este estudio en distintas poblaciones independientes (Marian, 2012).

Encontrar genes candidatos asociados a una patología permite comprender los mecanismos de patogenicidad de la enfermedad, convirtiéndolos en marcadores de riesgo, diagnóstico, pronóstico o en posibles blancos terapéuticos (Huizinga y col., 2004). Sin embargo, por el nivel de complejidad y la heterogeneidad presente en la población, es probable que muchos sean los genes involucrados, cada uno realizando una modesta contribución.

La selección de los genes candidatos puede tener una justificación posicional si asume que los genes de susceptibilidad con mayor efecto están ubicados y ligados a

otros genes relacionados con la enfermedad. La selección puede tener también una justificación funcional, si asume la alteración en la función o en niveles de expresión de la proteína codificada y su papel en la fisiopatología de la enfermedad, en este aspecto los polimorfismos genéticos son los más analizados (Delgado-Vega y col., 2007).

8.1. Genes candidatos para marcadores genéticos de infección congénita

8.1.1. Fosfatasa Alcalina Placentaria. Las fosfatasas alcalinas son enzimas hidrolasas responsables de eliminar grupos fosfatos de varios tipos de moléculas como nucleótidos, proteínas y alcaloides a pH básico. Estas enzimas están presentes en casi todos los tejidos del organismo, siendo particularmente alta en huesos, hígado, placenta, intestinos y riñón. Aquella enzima que se encuentra en el tejido placentario, se denomina PLAP (fosfatasa alcalina placentaria) y es producida por la cara fetal de la placenta. Se encuentra anclada a través de moléculas de glicosilfostatidilinositol de forma homodimérica (Holmgren y Stigbrand 1976) a la membrana plasmática apical y basal de sincitiotrofoblastos y, en menor medida, a la superficie de citotrofoblastos (Leitner y col., 2001). Su expresión aumenta de forma constante durante todo el embarazo hasta el término del mismo (Fishman, 1976). El gen *ALPP* es el encargado de codificar la proteína PLAP y se sabe que este gen presenta gran variabilidad y algunas de las variantes se asocian a patologías del embarazo.

Además, varios trabajos han puesto énfasis en el papel de PLAP en el proceso de invasión de *T. cruzi* en las células del sincitiotrofoblasto de la placenta (Sartori y col. 2005) por medio de mecanismos que involucran la hidrólisis de moléculas de glicosil-fosfatidil inositol, la activación de proteínas tirosin kinasas, el incremento del calcio citosólico y el reordenamiento de los filamentos de actina de la célula hospedadora. Existe evidencia confirmando este proceso, donde PLAP se encontraría involucrada, ya que se ha descripto que su actividad enzimática se encuentra disminuida en sueros de pacientes con enfermedad de Chagas cursando las 36 y 40 semanas de gestación, y esta disminución se asocia a nacimientos de bebés con infección congénita (Sartori y col., 1997). También se ha demostrado una disminución en la actividad de PLAP en sincitiotrofoblastos de placentas chagásicas (Fretes y de Fabro, 1990a), en vellosidades placentarias (Fretes y de Fabro, 1990b) y en células HEp2 co-cultivadas con *T. cruzi*

(Sartori y col., 2003; Mezzano y col., 2005). Esta disminución en la actividad enzimática se debería a la interacción entre las vellosidades placentarias y *T. cruzi*.

8.1.2. Metaloproteasas. Ya se ha demostrado que *T. cruzi* induce la destrucción del sincisiotrofoblasto en el corion velloso con una desorganización selectiva de la lámina basal y de colágeno I (Duaso y col., 2010). Para ello, el parásito secreta proteasas, como la cruzipaína y además aprovecha las proteasas endógenas del hospedero, como son las metaloproteinasas de matriz (MMPs).

Las MMPs pertenecen a una gran familia estructural compuesta por más de 20 endopeptidasas dependientes de cinc, capaces de degradar y remodelar componentes de la matriz extracelular. Las más estudiadas dentro de esta familia son la MMP2 (Gelatinasa A) y MMP9 (Gelatinasa B) que están involucradas en la regulación de la respuesta inflamatoria (Kemmerling y col. 2010). La infección con *T. cruzi* produce un aumento en los niveles de MMP2 y MMP9 y su inhibición provoca una disminución en miocarditis y mejora la sobrevida durante la fase aguda de la infección (Gutierrez y col., 2008). Por el contrario, alteraciones en la composición de la matriz extracelular, más precisamente el aumento en la cantidad de colágeno, han sido descriptas en miocardios de pacientes con miocarditis chagásica crónica (Higuchi y col., 1999). Es probable que durante la infección con *T. cruzi*, el parásito promueva inicialmente la degradación de la matriz extracelular, y como respuesta el hospedero produce un aumento en sus componentes.

Las MMPs tienen un papel fundamental durante infecciones placentarias. Por ejemplo, durante la infección con el virus del citomegalovirus humano, la expresión de MMP2 y MMP9 disminuye, previniendo la invasión del trofoblasto extravelloso durante la implantación del blastocisto, lo que puede causar aborto, nacimientos antes de término, o retraso en el crecimiento fetal (Tao y col., 2011). En cambio, la colonización del tracto cérvico-vaginal con microorganismos como estreptococos del grupo B, aumentan la expresión y la actividad de MMP9 (Estrada-Gutierrez y col., 2010). En estos pacientes, esta enzima se ve aumentada en el líquido amniótico, haciéndola buen indicador bioquímico de la infección intra-amniótica y un elemento predictivo de trabajo de parto o ruptura de membranas de forma prematura (Locksmith y col., 1999).

8.1.3. ADAM12. Es una proteína miembro de la familia de las desintegrinas y metaloproteinasas, está asociada a movilidad trofoblastica, anormalidades cromosómicas y preeclampsia en el embarazo (Pollheimer y col., 2014), dentro de otras patologías como cáncer de ovario, trastornos musculares, hipertrofia cardíaca y trastornos neurológicos (Kveiborg y col., 2008; Aghababaei y Beristain, 2015). A pesar de que ninguna variante en el gen que codifica para esta proteína ha sido asociada a trastornos en la placenta, si existen reportes de variantes asociadas a otro tipo de enfermedades (Harold y col., 2007; Laumet y col., 2010; Wang y col., 2015).

8.2. Genes candidatos para marcadores genéticos de CChC

La CChC es la miocardiopatía dilatada de origen infeccioso más frecuente del mundo. Varios trabajos han propuesto diferentes marcadores genéticos a la susceptibilidad de desarrollar CChC. Sin embargo, aún no se conocen los factores involucrados en el desarrollo de la patología cardíaca (Dutra y col., 2005).

Se ha postulado que esta cardiomiopatía es una forma de miocarditis crónica en la que el infiltrado del miocardio enriquecido en células T juega un rol patogénico fundamental (Marin-Neto y col., 2007). La persistencia del proceso inflamatorio se debe a la permanencia del estímulo (presencia de parásitos) o la ausencia de mecanismos reguladores endógenos, puede conducir a la inflamación crónica y la lesión de tejidos y la fibrosis. Por la complejidad que conlleva esta enfermedad, al igual que con la infección congénita, la progresión hacia esta afección hay que tener en cuenta diversos factores como son: factores genéticos del hospedero, ambientales, y la variabilidad existente dentro de *T. cruzi*.

En cuanto a la enfermedad de Chagas, hay evidencias de que las quimioquinas y sus receptores involucrados con el tipo de infiltrado celular presente en el tejido cardíaco podrían estar relacionados no sólo con el control de la infección, sino también con el daño tisular (Coelho y col., 2002; Talvani y col., 2004; Cunha-Neto y col., 2005; Marino y col., 2005; Medeiros y col., 2009). Más aún, existe un gran número de estudios genéticos que asocian quimioquinas y citoquinas con el desarrollo de la cardiopatía chagásica (Vasconcelos y col., 2012).

Dentro de los trabajos publicados por este grupo de la Dra. Clara Isabel González, se encuentra el de Zafra y col., 2007 que encontró que polimorfismos ubicados en el 3´UTR de la IL-12B podrían influenciar la susceptibilidad al desarrollo de la cardiomiopatía chagásica. Un año antes, los estudios de Flórez y col. (2006) habían sugerido también que un grupo de polimorfismos en el gen que codifica para IL1 otorgaba cierta susceptibilidad al desarrollo de esta patología. Posteriormente, en un trabajo que abarcaba tanto población procedente de Colombia como de Perú, Torres y col. (2009) observaron que el polimorfismo -173G/C en el gen que codifica para el factor inhibitorio de la migración de macrófagos (MIF) también otorgaba susceptibilidad.

De este mismo grupo de investigación han surgido dos trabajos más recientes donde encuentran una asociación de los polimorfismos ubicados en las posiciones -1013 y -308 del gen que codifica para TNFα (Criado y col., 2012) y de los polimorfismos en las posiciones -2733 y -2554 del gen que codifica por CCR5 (Flórez y col., 2012) a cierta susceptibilidad y severidad al desarrollo de la cardiomiopatía chagásica. Es importante destacar que tanto CCR2 como CCR5 son receptores de quimioquinas CC, importantes en el tráfico de células T, monocitos / macrófagos y en las funciones de otros tipos de células relevantes en la patogénesis de las enfermedades cardiovasculares (Zhao y col, 2010).

A pesar de esta gran cantidad de trabajos ya publicados, no se ha descripto este tipo de polimorfismos en la población argentina.

OBJETIVO GENERAL

Estudiar y describir el rol que cumplen distintos factores genéticos del hospedero mamífero asociados a dos aspectos fundamentales de la enfermedad de Chagas: la transmisión materno-fetal de *Trypanosoma cruzi* y la CChC.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS

1) Describir la expresión génica como respuesta a la infección por *T. cruzi* generada por la placenta en ratones.

Detección y comparación de las vías involucradas en dicha respuesta mediante análisis transcriptómicos frente a dos cepas del parásito correspondientes a distintos genotipos y con diferentes características de infección: K98 (TcI) y VD (TcVI).

2) Identificar polimorfismos humanos funcionales en genes candidatos de expresión placentaria asociados a susceptibilidad a la infección congénita de *T.cruzi*.

Búsqueda de genes candidatos de expresión placentaria y de variantes génicas funcionales de los mismos, utilizando bases de datos de secuencias de ADN y del proyecto de HapMap.

Desarrollo de estrategias de análisis de curvas de alta resolución y de electroforesis capilar que permitan la identificación de las distintas variantes genéticas en las regiones polimórficas seleccionadas.

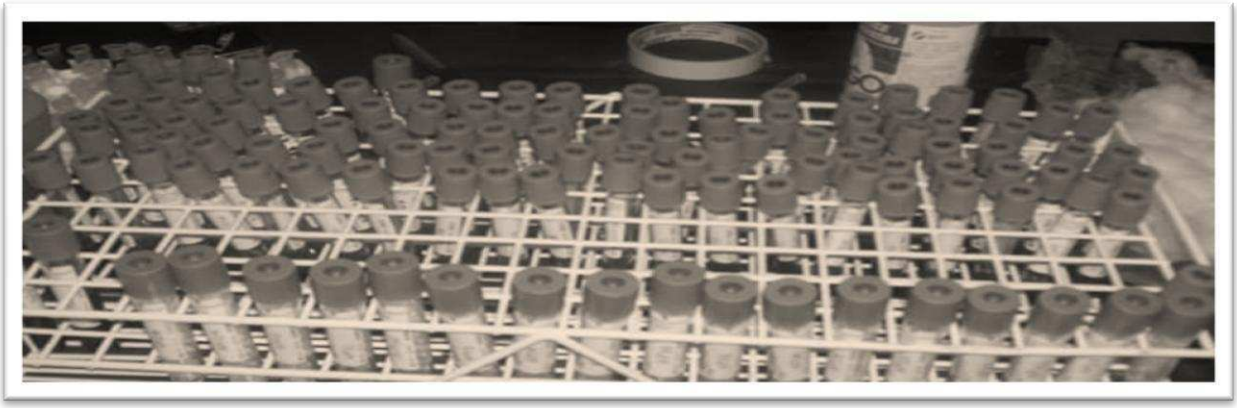
Estudio de asociación de estos sitios polimórficos y la infección congénita de *T. cruzi* por comparación de las frecuencias observadas en niños nacidos de madres con serología positiva para Chagas con y sin infección congénita.

3) **Determinar el efecto de polimorfismos de nucleótido simple en genes que codifican para proteínas relacionadas al sistema inmune en el desarrollo de la cardiopatía chagásica crónica en población de Argentina.**

Genotipificación por PCR multiplex en tiempo real con sondas TaqMan de sitios polimórficos de los genes que codifican para los receptores de proteínas denominadas C-C de tipo 5 (CCR5) y tipo 2 (CCR2).

Análisis de estas variantes genéticas y su asociación con la CChC en individuos de población argentina.

MATERIALES y MÉTODOS



1. Materiales

1.1. Soluciones y tampones de uso general

EDTA 0.5M pH 8.0: (250ml) 46.53g de EDTA, 175ml de H_2O, agitar con calor, llevar a pH 8,0 con NaOH 10N, completar volumen con H_2O y autoclavar.

Guanidina 6 M-EDTA 0,2 M (GE) (1 l): 573,2 g de cloruro de guanidina; 400 ml de EDTA (0,5 M; pH 8,0); llevar a volumen con H_2O destilada. Esterilizar por autoclave.

Siembra de ADN 6X: glicerina 60% v/v; azul de bromofenol 0,25% p/v; xilencianol 0,25% p/v.

TAE (1 l): 4,84 g de Tris Base; 1,034 ml de ácido acético glacial; 2 ml de EDTA (0,5 M; pH 8,0). Llevar a volumen con H_2O destilada.

TE pH 8,0: Tris-HCl 10 mM; EDTA 1 mM.

PBS: NaCl 138 mM; KCl 3 mM; Na_2HPO_4 8,1 mM; KH_2PO_4 1,5 mM; pH 7,4. Esterilizar por autoclave.

TBS: Tris-HCl 50 mM, NaCl 150 mM, (pH 7,4).

TBS-T20: Tween 20 0,1% (v/v) en TBS.

Solución de lisis celular: HEPES 10 mM, NP40 0,1%, EDTA 2 mM, NaCl 150 mM en presencia de inhibidor de proteasas Complete Mini EDTA-Free (Roche, Alemania).NaOH

Solución de muestra (cracking buffer) 5X: Tris-Cl 300 mM (pH 6,8), SDS 10%, Glicerol 50%, β-Mercaptoetanol 25%, Azul de Bromofenol 0,05%.

Solución de Corrida: Glicina 385mM, Tris Base 50mM, SDS 0,1% (p/v).

Solución de gel de concentración (4X): Tris-HCl 1M pH 6,8.

Solución de gel de separación (4X): Tris-HCl 1.5M pH 8,0.

Solución de Transferencia: Glicina 385mM, Tris Base 50mM, Metanol 20% (v/v).

Solución colorante Rojo Ponceau: Ponceau S 0,5% (p/v), Ácido Acético 1% (v/v).

1.2. Reactivos

1.2.1. Marcadores de peso molecular

10 bp DNA ladder (Invitrogen™). Pesos moleculares (pb): 10- 20- 30- 40- 50- 60- 70- 80- 90- 100- 110- 120- 130- 140- 150- 160- 170- 180- 190- 200- 210- 220- 230- 240- 250- 260- 270- 280- 290- 300- 310- 320- 330.

25 bp DNA ladder (Invitrogen™). Pesos moleculares (pb): 25- 50- 75- 100- 125- 150- 175- 200- 225- 250- 275- 300- 325- 350- 375- 400- 425- 450- 500.

1 kb plus DNA ladder (Invitrogen™). Pesos moleculares (pb): 100- 200- 300- 400- 500- 650- 850- 1.000- 1.650- 2.000- 3.000- 4.000- 5.000- 6.000- 7.000- 8.000- 9.000- 10.000- 11.000- 12.000.

1.2.2. Enzimas. Las enzimas Taq ADN polimerasa, con sus respectivos tampones, fueron adquiridas en Promega, así como también la enzima ADNasa; las mezclas de reacción de PCR comerciales, en Roche (FastStart Universal Probe Master Mix, para las reacciones con sonda TaqMan® y FastStart Universal SYBR Green Master, para las reacciones de expresión génica); en Qiagen (Type-it HRM PCR Kit, para genotipificación); y en Invitrogen se adquirió la enzima para retrotranscripción SuperScript™ II.

Las enzimas de restricción MspI + RsaI + HinfI y sus buffers de reacción correspondientes son de New England BioLabs.

1.2.3. Equipos comerciales para la purificación de ADN

High Pure PCR Template Preparation kit (Roche)

PCR and DNA Fragment Purification Kit (DS-BIO)

QIAquick® PCR Purification Kit (QIAGEN)

2. Áreas de trabajo

Como consecuencia de la elevada sensibilidad de los métodos utilizados para la amplificación del ADN, las técnicas poseen un considerable peligro de contaminación. Para disminuir este riesgo se utilizaron tres áreas físicamente separadas y aisladas una de otra:

i) Área de preparación de reactivos, en la cual se prepararon y almacenaron los reactivos para las mezclas de reacción de PCR y extracción de ADN, así como el tampón GE. Asimismo, en este sector se prepararon las mezclas de PCR. Esta área permanece cerrada, con fuente de luz ultravioleta (UV), y se encuentra destinada exclusivamente para este fin.

ii) Área de preparación de muestras, en la cual se realizaron los procesos previos a la reacción de amplificación: preparación de la muestra y aislamiento del ADN. En este espacio también se añadieron los templados de ADN a los tubos de PCR. Esta área es cerrada, cuenta con fuente de luz UV para descontaminación de pipetas y mesadas, y está destinada exclusivamente al procesamiento de muestras clínicas para PCR.

iii) Área de amplificación y análisis de productos de PCR, en donde se realizan la amplificación de los diferentes blancos moleculares y el análisis de los productos de PCR a través de electroforesis y otros procedimientos.

En cada una de estas zonas de trabajo se utilizaron reactivos y materiales de uso exclusivo para ellas, incluyendo delantales, guantes descartables, micropipetas, puntas con filtro, tubos, agua y reactivos, que no se intercambian con las otras áreas.

3. Métodos

3.1. Recolección de muestras

3.1.1. Muestras murinas. Hemos propuesto el modelo murino como primera aproximación para comprender los genes que se expresan de forma diferencial en una placenta proveniente de una madre infectada con *T. cruzi*, basándonos en un trabajo previo (Cox y col., 2009) donde se compara tanto la transcriptómica como la proteómica de la cepa C57BL/6J de ratón y placentas humanas, reportando un grado de conservación de aproximadamente el 80% de genes fenotípicos que son co-expresados en humano y ratón.

Se utilizó la cepa C57BL/6J proveniente del Bioterio de la Facultad de Ciencias Exactas y Naturales de la UBA. Los experimentos se llevaron a cabo en el Bioterio de la Cátedra de Microbiología de la Facultad de Medicina de la UBA. La alimentación y administración de agua a los animales fue *ad-libitum*. Este proyecto ha sido aprobado por el Comité Institucional para el Cuidado y Uso de Animales de Laboratorio (CICUAL) de la Facultad de Medicina de la UBA, bajo el título "Comparación de la respuesta placentaria inducida por TcI y TcVI de *Trypanosoma cruzi* en el modelo murino", Resol 2426/2015.

3.1.1.1. Infección y grupos de estudio. Se infectaron 4 hembras entre las 8-12 semanas de edad con *T. cruzi* cepa VD con una dosis de 50 parásitos vía intradermoplantar. Otras 4 hembras de la misma edad fueron infectadas utilizando la misma vía con 500 parásitos de la cepa K98 de *T. cruzi* la cual presenta menor virulencia que VD, por ello se decidió infectar con una carga mayor. Para la propagación de tripomastigotes sanguíneos tanto de la cepa VD como K98, se utilizó la cepa de ratones BALB/c realizando pasajes semanales. Como grupo control, 4 hembras sin infectar de la misma edad y peso fueron sometidas a los mismos procedimientos.

La parasitemia se midió semanalmente por recuento en una cámara de Neubauer de las forma tripomastigota a partir de sangre venosa de la cola diluida (1/10) en solución de lisis de glóbulos rojos (Tris-NH_4Cl 0,83% pH 7,2). Se consideró la no detección de parásitos en la cámara como fase crónica de la enfermedad (alrededor de 4 semanas después de la infección).

3.1.1.2. Apareamientos, sacrificio y toma de muestras. Al llegar a la fase crónica, las hembras fueron colocadas en la misma jaula con un ratón macho para que ocurra el apareamiento (2 hembras/macho). Diariamente se realizaron revisiones de las hembras de manera de detectar la presencia de un botón mucoso indicando el apareamiento previo (día 0,5 post-apareamiento).

Durante el día 18,5 ± 1 post-apareamiento y al observarse un aumento de peso que indicase preñez, las hembras fueron anestesiadas en cámara con dióxido de carbono. Posteriormente, se procedió a la toma de 150 µL de sangre materna por punción cardíaca conservada en un volumen de GEB para determinar la carga parasitaria. Luego, se hizo una incisión en el vientre para descubrir el útero y así los fetos, de los cuales se extrajo músculo esquelético de sus patas traseras, así como también la placenta correspondiente. El músculo esquelético fue procesado inmediatamente y las placentas se sumergieron rápidamente en la solución estabilizante y de almacenamiento RNAlater® (Applied Biosystems, Foster City, EE.UU.), incubadas 24 horas a 4°C y finalmente almacenadas a -20°C. Cada feto con su respectiva placenta fue identificado según su ubicación en el útero (rama derecha o izquierda y posición respecto al canal de alumbramiento).

3.1.2. Muestras humanas

Los protocolos de experimentación con muestras humanas siguieron los principios de la Declaración de Helsinki en la resolución 1480/11 del Ministerio de Salud de la Argentina.

3.1.2.1. Muestras de niños y recién nacidos de madres seropositivas para Chagas. Este protocolo fue aprobado por los comités de ética de las instituciones participantes: Comité Provincial de Bioética de Jujuy y Comité de Bioética Dr. Vicente Federico del Giúdice del Hospital Nacional Profesor Alejandro Posadas. Los pacientes incluidos fueron informados sobre la utilización de las muestras tomadas debiendo firmar, previo a ello, un consentimiento para tal fin.

Se realizó un estudio del tipo caso-control, el cual incluyó 217 niños nacidos de madres seropositivas para *T. cruzi*, provenientes de áreas de alta endemicidad de Argentina (provincias de Salta, Jujuy, Misiones, Chaco y Santiago del Estero), Bolivia

(departamentos de Cochabamba, Santa Cruz y Potosí) y Paraguay. Estos niños fueron clasificados en dos grupos: 101 niños con infección congénita (Grupo IC), y 116 niños no infectados (Grupo NIC). Las muestras fueron colectadas en los centros de salud por personal calificado, mediante los equipos y técnicas utilizados en cada institución. El diagnóstico de la infección congénita se basó en los métodos de rutina, micrométodo o análisis de microhematocrito en neonatos y en bebés menores a 6 meses y por dos ensayos serológicos concordantes luego de los 9 meses. Se consideró infección congénita en aquellos niños nacidos en áreas no endémicas, que no hayan recibido transfusiones o viajado a regiones endémicas para *T. cruzi*, antes de la toma de la muestra.

El 70% de las muestras correspondieron a muestras de ADN almacenadas a -20°C extraídas a partir de sangre periférica conservadas con un volumen de GE. Ochenta de estas muestras fueron aportadas por el Instituto Nacional de Parasitología Dr. Mario Fatala Chabén, y 72 muestras aportadas por nuestro laboratorio. La edad promedio de los niños fue de 5,74 años (rango: 9 meses – 17 años). El restante 30% de las muestras se obtuvieron de sangre periférica conteniendo GE de 55 recién nacidos cuyos partos ocurrieron en el Hospital Pablo Soria de Jujuy (Período: agosto 2011 - septiembre 2012) y 10 nacidos en el Hospital Nacional Profesor Alejandro Posadas en Buenos Aires.

3.1.2.2. Muestras de adultos con serología positiva para Chagas. Se realizó un estudio de casos y controles de 345 individuos con una edad promedio de 46,39 años y un rango de 18 a 85 años.

Las muestras de sangre de pacientes se extrajeron en los centros de salud que colaboraron con los estudios aquí presentados, en el marco de distintos protocolos de investigación clínica, debidamente aprobados por los correspondientes comités de ética: Hospital Italiano, Fundación Favaloro y Hospital Ramos Mejía de Buenos Aires. Los pacientes incluidos fueron informados sobre la utilización de las muestras tomadas debiendo firmar, previo a ello, un consentimiento para tal fin. Las muestras fueron colectadas en los centros de salud, por personal calificado, mediante las técnicas y equipos de rutina utilizados en cada institución. Los estudios clínicos y cardiológicos, como el electrocardiograma (ECG), así como también la serología para Chagas fueron realizados por cada centro.

Así mismo, se obtuvieron muestras de la región del Gran Chaco argentino en distintos operativos realizados entre los años 2013 y 2016 en conjunto con el médico cardiólogo especializado en la enfermedad de Chagas, el Dr. Daniel Hernández (Facultad de Medicina, Universidad Nacional del Nordeste, Corrientes). Estos operativos fueron llevados a cabo en las localidades de Río Muerto, Las Hacheras, Misión Nueva Pompeya, Miraflores de la provincia de Chaco y Las Lomitas, Pozo del Tigre, Laguna Yema, Estanislao del Campo de la provincia de Formosa, con alta prevalencia de población originaria perteneciente a la etnia *wichi*. Se colectaron 10 ml de sangre periférica, la mitad fue centrifugada en campo y el suero separado para la realización de la serología pertinente en la Cátedra de Parasitología de la Carrera de Bioquímica de la Facultad de Ciencias Exactas de la UNNE, Corrientes, mientras que la otra mitad se conservó en tubos con EDTA a 4°C por un tiempo no mayor a 48 hs. La realización del ECG de 12 derivaciones se hizo a cada paciente en campo, siendo el único estudio cardiológico, además del examen clínico, debido a las dificultades de llevar otros equipos a campo.

Los individuos con serología positiva para Chagas, sin sintomatología clínica y con ECG normal fueron clasificados como individuos con infección crónica sin patología demostrable y representaron el grupo control (Grupo SCD) y por otra parte, aquellos con serología positiva para Chagas y que mostraron alteraciones clínicas y en el ECG, fueron clasificados como individuos con patología demostrable y representaron el grupo de los casos (Grupo CCD) (Consenso de Enfermedad de Chagas-Mazza, 2011). La edad, el género y la pertenencia o no a la etnia *wichi* fueron datos tomados como co-variables en este estudio.

3.2. Extracción de ácidos nucleicos

3.2.1. Extracción de ADN. A partir de muestras sanguíneas y de tejidos se extrajo ADN utilizando el kit comercial *High Pure PCR Template Preparation* (Roche) basado en columnas de fibra de vidrio. A continuación se describe detalladamente el protocolo seguido:

1. En un vial de 2 mL se agregó 40 µL de proteinasa K, 100 µL de buffer de pegado y 2 µL de control interno de amplificación "IAC" (100 pg/µL) (Duffy y col., 2013).

2. A la mezcla del tubo anterior, en el caso de las muestras de tejido se tomó una sección e incubó 1 hora a 55°C con 200 µL de buffer de lisis. Para las muestras sanguíneas, se homogeinizaron (vortex 15-30 seg) y se tomaron 300 µL como volumen de partida.

3. Se mezcló 15 seg en vortex e incubó a 70°C durante 10 min en bloque térmico. Luego se agregaron 100 µL de isopropanol, se agitó 15 seg en vortex. El volumen total se incorporó en su correspondiente columna High Pure Filter en un tubo colector de 2 mL.

6. Se centrifugó a 8.000 rpm durante 1 min, el tubo colector con el eluato fue descartado y se colocó la columna en un nuevo tubo colector. Se añadió 500 µL de solución removedora de inhibidores y se centrifugó en las mismas condiciones descritas anteriormente, descartando el tubo con el eluato.

9. Se repitieron dos etapas similares al paso anterior, pero con el agregado de solución de lavado.

10. La columna se centrifugó a máxima velocidad para la eliminación del etanol residual. Por último, se agregaron 100 µl de tampón de elución precalentado a 70°C y se centrifugó a 8.000 rpm durante 1 min. El eluato obtenido se conservó a -20°C para su posterior análisis.

3.2.2. Extracción de ARN. Se recuperaron las muestras almacenadas en solución ARNlater® con pinzas estériles, rápidamente eliminando los excesos de la solución con un papel absorbente. Se extrajo ARN total del tejido utilizando el compuesto TRIzol® (Invitrogen, Carlsbad, CA) según las instrucciones del fabricante. Brevemente:

1. Se homogenizaron las muestras de tejido usando 1 mL de TRIzol® cada 50-100 mg de tejido utilizando un émbolo plástico y luego por varios pasajes en agujas G21 y posteriormente G25. Se centrifugó 15 min a 15.000 x g a 4°C y se tomó el sobrenadante de manera de eliminar el material y se incubó el lisado a temperatura ambiente por 5 min para completar la disociación de los complejos nucleoproteicos.

2. Se agregó 0,2 mL de cloroformo y se mezcló vigorosamente durante 15 seg, seguido de una nueva incubación a temperatura ambiente durante 3 min. Se procedió a centrifugar a 12.000 x g durante 15 min a 4°C, de forma tal de separar la mezcla en una parte inferior (roja de fenol-cloroformo), una interfase, y una parte superior incolora que

contiene el ARN. Esta última se transfierió a un nuevo tubo enfriado previamente en hielo.

3. Se añadió 0,5 mL de isopropanol 100% e incubó a temperatura ambiente durante 10 min. Se centrifugó 12.000 x g durante 15 min a 4°C, en cuyo precipitado se encuentra el ARN.

4. Este precipitado se lavó con 1 mL de etanol 75%, y centrifugación a 7.500 x g durante 5 min a 4°C. El precipitado obtenido se secó por 5-10 min a 37°C.

5. Por último, se resuspendió el precipitado en 30 µL de agua libre de ARNasa. Se incubó a 55-60°C durante 10-15 min y se almacenó a -80°C.

Para mantener la integridad de ARN, todos los pasos fueron llevados a cabo en hielo, el material plástico libre de ARNsas, y las mesadas y el material reutilizado se limpió con solución NaOH 0,1%-SDS 1%.

3.3. Digestión con enzimas de restricción

Se mezclaron las cantidades necesarias de buffer 10X (provisto por el fabricante junto con la enzima correspondiente), con 1 µg de ADN (amplicón producto de PCR de ADN del minicirculo de *T. cruzi*), enzima de restricción y agua bidestilada. La mezcla fue incubada durante 4 horas a la temperatura 37°C con 1 unidad de enzima de restricción.

3.3.1. Distancias genéticas de Jaccard. La similitud entre perfiles de digestión se cuantificó mediante las distancias de Jaccard (DJ), en base a la observación de la digestión en una electroforesis en gel de poliacrilamida. La DJ corresponde a: 1 – fragmentos presentes en ambos perfiles / (fragmentos presentes en ambos perfiles + fragmentos propios de cada perfil).

3.4. Obtención de ADN copia

3.4.1. Tratamiento con ADNasa. Para eliminar contaminación con ADN, en un volumen final de 10 µL se mezcló 2 µg de ARN obtenido anteriormente con 1X de solución de reacción de ADNasa RQ1 libre de ARNasa y 1 µl de la enzima ADNasa (Promega). Se incubó la reacción en un bloque térmico 30 min a 37°C, y la misma se detuvo por agregado de 1 µL de solución de frenado de la enzima ADNasa.

3.4.2. Síntesis de ADN copia. 1 µg de ARN por muestra del paso anterior fue transcripto de forma reversa utilizando el kit SuperScript™ II Reverse Transcriptase (Life technologies, Ontario, CA), siguiendo las instrucciones del fabricante: al ARN se agregó 1 µL de cebadores decámeros randomizados y 1 µL de mezcla de dNTPs (10 mM cada uno) y agua libre de ARNasa hasta un volumen final de 12 µL. Se incubó 5 min a 65°C y rápidamente se colocó en hielo. Luego de una breve centrifugación, se agregaron 4 µL de solución tampón First-Strand 5X y 2 µL de DTT (0,1 M). Esta mezcla se incubó 2 min a temperatura ambiente. Por último, se añadieron 200 unidades de la transcriptasa reversa SuperScript™ II, se dejó la reacción 50 min a 42°C y se detuvo a 70°C por 10 min. El ADN copia obtenido se conservó a -20°C.

3.5. Selección de genes candidatos y polimorfismos

Se realizó una extensa búsqueda bibliográfica para la selección de genes candidatos a estar asociados con la infección congénita en la base de datos de PubMed/MEDLINE del National Center for Biotechnology Information (NCBI, National Library of Medicine, National Institutes of Health, EE.UU). No se hicieron restricciones en cuanto a lenguaje ni fecha de publicación. La búsqueda que se llevó a cabo comprendió hasta abril de 2013. Las siguientes palabras claves fueron utilizadas: "vertical transmission" OR "congenital" AND "Chagas" OR "*Trypanosoma cruzi*" AND "placenta". El término "placenta" fue adicionado para restringir la búsqueda sólo a proteínas cuya expresión es relevante en este tejido. Una vez seleccionados los genes, se procedió a la búsqueda avanzada de los mismos en la base de datos dbSNP del NCBI (disponible en el sitio http://www.ncbi.nlm.nih.gov/snp/), que es una base de datos de acceso libre donde se catalogan todos los polimorfismos descriptos en el genoma humano y ofrece información sobre su localización en las distintas regiones del gen correspondiente.

3.6. Diseño de oligonucleótidos cebadores

El diseño de los oligonucleótidos cebadores se realizó con la asistencia de la aplicación del software Primer-BLAST del NCBI (disponible en el sitio http://www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/primer-blast/) para verificar la especificidad de las secuencias elegidas, y la herramienta OligoAnalyzer (disponible en el sitio

https://www.idtdna.com/calc/analyzer) para identificar las propiedades de los oligonucleótidos, la formación de horquillas, dímeros y heterodímeros.

3.7. Visualización y cuantificación de ácidos nucleicos y proteínas

3.7.1. Cuantificación y medida de pureza. La concentración de ADN y ARN se realizó midiendo la absorbancia a 260 nm, y la pureza se determinó por la proporción DO 260 nm/280 nm y DO 230 nm/280 nm, utilizando el equipo Nanodrop1000® (Thermo Scientific, Wilmington, Delaware).

3.7.2. Geles de agarosa. La detección y separación de los fragmentos amplificados por PCR, así como también la determinación de la integridad del ARN se realizó mediante corridas en geles de agarosa. El porcentaje de agarosa utilizado fue variable, oscilando en el rango de 0.8-3%, dependiendo del tamaño de los fragmentos a separar. Los geles se prepararon fundiendo la agarosa en el volumen correspondiente de tampón TAE 1X. La disolución de la misma se realizó por calentamiento en horno microondas y tras el enfriado parcial de la solución se agregó bromuro de etidio. Previo a la siembra, las muestras de ADN se mezclaron con 0,2 volúmenes de tampón de siembra 6X. La electroforesis se llevó a cabo en tampón TAE 1X, a voltaje constante (100-120 V), en cubas de electroforesis horizontales. Se utilizaron marcadores de peso molecular, y la corrida se visualizó en un transiluminador de emisión UV a 302 nm (Syngene). Las imágenes de los geles fueron guardadas en formato digital.

3.7.3. Geles de poliacrilamida. Los análisis de fragmentos de ADN, productos de digestiones enzimáticas (RFLP) fueron analizados por electroforesis en geles de poliacrilamida. Los mismos se realizaron al 10% de poliacrilamida, utilizando la solución acrilamida: bisacrilamida (29:1). La electroforesis se realizó a corriente constante de 30 mA para la mejor separación y definición de los fragmentos de ADN generados. Se utilizó el buffer TBE 1X para el armado del gel y para la electroforesis. Previo a la siembra, las muestras de ADN fueron mezcladas con 0,2 volúmenes de buffer de siembra 6X. Se utilizaron marcadores de peso molecular Invitrogen. Posteriormente a la electroforesis, los geles se tiñeron con Sybr Gold. El ADN se visualizó mediante transiluminador de emisión UV a 498 nm con el transiluminador Syngene. Los geles fueron fotografiados o

guardados digitalmente. Las electroforesis en geles de poliacrilamida se analizaron con el software GelAnalyzer (www.gelanalyzer.com).

3.7.4. Western blot. Con el fin de corroborar la expresión a nivel de proteínas, las muestras de placentas almacenadas en RNAlater® se lisaron y homogenizaron utilizando la siguiente solución de lisis: 50 mM Tris-HCl, NaCl 150 mM, pH 7,4 (TBS) en presencia de 0,1% de SDS y un kit de inhibidor de la proteasa (Complete Mini libre de EDTA-, Roche, Alemania). Los homogenezados se centrifugaron a 17.000 × g durante 10 min a 4°C para eliminar el material insoluble. La concentración de proteína de los sobrenadantes se determinó por medio del reactivo de Bradford (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, EE.UU.) y la misma cantidad de proteínas (100 µg por carril) se resolvió en un SDS-PAGE 10%. Después de la transferencia y el bloqueo de las membranas de nitrocelulosa con TBS, 0,1% Tween 20 (TBS-T) 3% de BSA, se incubaron durante toda noche a 4°C con anticuerpo policlonal en conejo anti-CXCL1, con una dilución 1:2000 (PAI-2920, Thermo Fischer, Rockford, IL, EE.UU.), o anticuerpo monoclonal de rata anti-CD274 en una dilución 1:1000 (10F.9G2, Bio X Cell, West Lebanon, New Hampshire, EE.UU.) en TBS-T 1% de BSA. Luego de lavar las membranas con TBS-T, las mismas se incubaron con IgG de rábano picante conjugado con peroxidasa anti-conejo en 1:3000 (Vector Labs, Reino Unido) o peroxidasa de rábano picante conjugada con IgG anti-rata en 1:3000 (Sigma-Aldrich, St Louis, MO, EE.UU.), respectivamente. Las proteínas inmunorreactivas fueron revelados por un aumento de quimioluminiscencia (ECL-Plus Pierce®, Thermo Scientific, Rockford, IL, EE.UU.) según las instrucciones del fabricante. Las bandas se escanearon y se cuantificaron utilizando el software ImageJ (versión 1.410).

Las mismas membranas fueron reveladas luego con anticuerpo monoclonal en conejo anti-GAPDH 1:5000 (14C10, Señalización Celular, Boston, MA, EE.UU.), como control de carga. Para ello, las membranas se incubaron con una solución tampón para eliminar los anticuerpos anteriores (200mM glicina-HCl pH 2,2, 0,1% SDS, 1% de Tween 20) dos veces durante 10 min a temperatura ambiente con agitación, se lavaron con TBS-T, y después de bloquear, fue immunodetecteda la proteína GAPDH como se describe anteriormente.

3.8. Detección y cuantificación de *T. cruzi*

3.8.1. PCR en tiempo real con sondas TaqMan a partir de ADN. Las sondas TaqMan permiten medir la producción de productos de PCR mediante un sistema de sondas marcadas con distintos fluorocromos. Su ventaja radica en que poseen un fluoróforo en su extremo 5' y una molécula en el 3' que bloquea su emisión de fluorescencia (denominada en inglés «quencher»); esta sonda marcada hibrida específicamente en la parte central del producto de PCR a obtener. De este modo, cuando se efectúa la PCR (con la sonda más el par de cebadores específicos), la sonda hibrida en el amplicón, pero debido a la cercanía del fluoróforo al quencher, no se emite fluorescencia. Cuando la polimerasa se topa con la sonda la hidroliza mediante su actividad exonucleasa 5'-3', lo cual provoca la separación del quencher del fluorocromo y, por tanto, hay emisión de fluorescencia. Dicha fluorescencia está relacionada con la cantidad de amplicón producido.

En este trabajo la detección y cuantificación de *T. cruzi* se realizó siguiendo el protocolo desarrollado en nuestro laboratorio (Duffy y col., 2013), cuya secuencia blanco es secuencia de ADN satélite de *T. cruzi* y del IAC en una misma reacción "multiplex".

En las muestras murinas se normalizó la carga parasitaria a partir de ADN, realizando el cociente por el valor obtenido por interpolación en una curva patrón de ADN correspondiente a *β-Actina* de ratón. Esta reacción se realizó en un volumen final de 20 µl: 1X de la mezcla de reacción FastStart Universal SYBR Green Master (Rox), 150 µM de los oligonucleótidos β-ACT Fw: 5´ CGGAACCGCTCATTGCC 3´ y β-ACT Rv: 5´ ACCCACACTGRGCCCATCTA 3´) y 2 µL de ADN como templado. La amplificacíon se llevó a cabo en el equipo de PCR en tiempo real ABI 7500 con las siguientes condiciones de ciclado: 10 min de preincubación a 95°C, 40 ciclos de 95°C durante 15 seg y 63°C durante 1 min, con lectura de la señal de fluorescencia al final de cada ciclo. Una vez finalizada la reacción de PCR se realizó una curva de desnaturalización de los amplicones que consiste en una etapa inicial de desnaturalización de 15 seg a 95°C, seguida por un incremento gradual en la temperatura de 0,1°C/seg de 65-95°C.

3.8.2. PCR en tiempo real a partir de ADN copia. La presencia de ARN de *T. cruzi* en las placentas murinas se evaluó por amplificación del ARNr 18S en las muestras

placentarias. Con este propósito cada reacción de RT-qPCR se preparó con 0,15 µM de la mezcla de oligonucleótidos (18S Fw: 5´ TGGAGATTATGGGGCAGT 3´ y 18S Rv: 5´ GTTCGTCTTGGTGCGGTCTA 3´, ver Resultados R1 3.2.1), una concentración 1X de la mezcla de reacción FastStart Universal SYBR Green Master (Roche Diagnostics Corp.), una concentración 300 nM de oligonucleótidos y una dilución 1:100 en agua libre de ARNasas del templado de ADN copia (ver Materiales y Métodos 3.4). Además se normalizaron los valores con la amplificación del ARN mensajero de expresión constitutiva *Gapdh* (glyceraldehido-3-fosfato dehidrogenasa) de ratón, con la misma mezcla de reacción que para 18S y con las secuencias de oligonucléotidos *Gapdh* Fw: 5´ ACTCCCACTCTTCCA 3´ y GAPDH Rv: 5´ TCCACCACCCTGTTG 3´.

Las amplificaciones se llevaron a cabo en el equipo Applied Biosystems 7500 Real-Time PCR System. Las condiciones de ciclado fueron para ambas PCRs las siguientes: 95°C 10 min, 40 ciclos de 95°C 15 seg y 1 min a 60°C ó 64°C y una curva de disociación de 65 a 95°C.

3.8.3. PCR anidada para determinación de microsatélites. Se llevó a cabo una PCR anidada dirigida a secuencias flanqueantes a repeticiones de microsatélites de los *loci* TcTAC15, TcATT14, TcGAG10, TcCAA10 y TcTAT20, como se describió anteriormente (Valadares y col., 2008). Cada PCR se realizó en un volumen total de 15 µl utilizando 1 unidad de Taq ADN polimerasa Platinum (Invitrogen, Carlsbad, CA). Las primeras rondas de PCR se llevaron a cabo usando 2 µl de ADN obtenido a partir de muestras de sangre y tejidos de la placenta (Sección Materiales y Métodos 3.2.1), mientras que para la segunda PCR redondea 1 µl de los productos amplificados obtenidos en la primera ronda de PCR se utilizaron como molde. Las amplificaciones se realizaron en un termociclador Veriti (Applied Biosystems, Foster City, CA). Para determinar los tamaños de los alelos, 0,5 µl del producto fluorescente de PCR se analizaron en un gel 6 % de poliacrilamida en condición desnaturalizante en un secuenciador de ADN ALF (GE Healthcare, Milwaukee, WI) y se comparan con los fragmentos de ADN fluorescentes de 75 a 320 pb utilizando el software Allelelocator (GE Healthcare).

3.9. Genotipificación de muestras humanas

3.9.1. Genotipificación de genes de expresión placentaria. Se determinó el genotipo para genes de expresión placentaria en las muestras de ADN obtenidas en la sección Materiales y Métodos 3.2.1 mediante las técnicas detalladas a continuación:

3.9.1.1. Análisis de Curvas de Disociación de Alta Resolución (HRMA). Comparando con los sistemas basados en sondas TaqMan o de transferencia de energía por resonancia de fluorescencia (FRET), el HRMA es más simple y tiene mayor relación costo-beneficio para la caracterización de múltiples muestras.

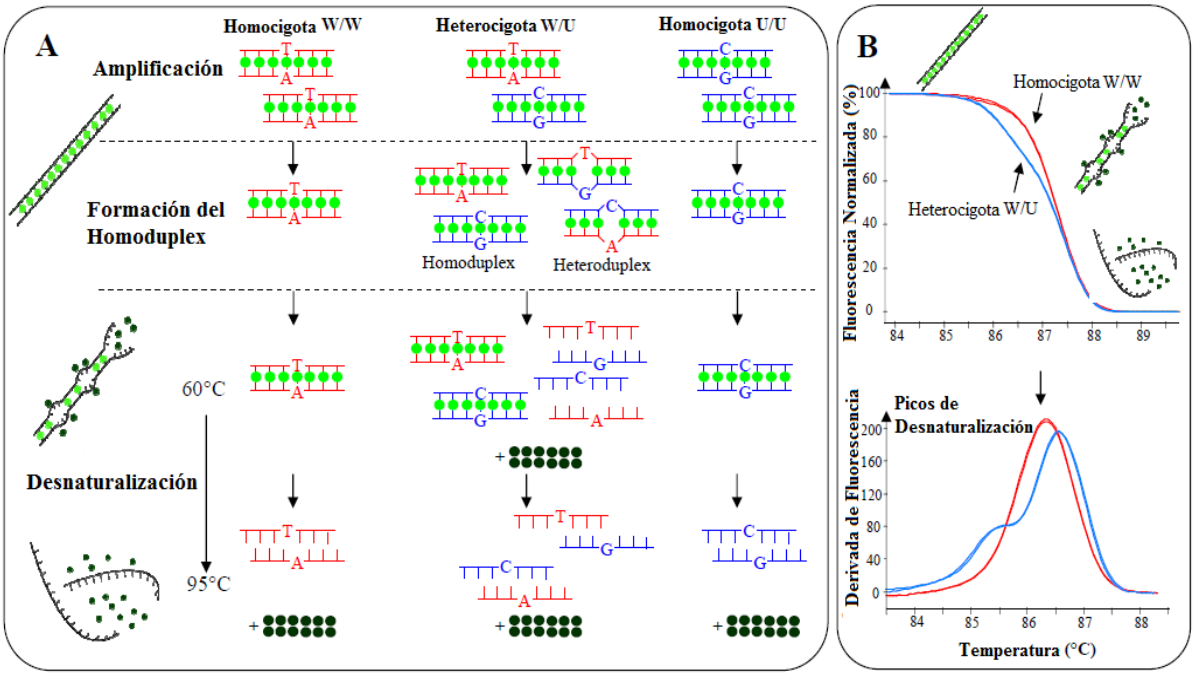


Figura M1: (A) Fragmentos de ADN amplificados utilizando un colorante intercalante fluorescente de ADN, disociados por calentamiento y re-hibridados por disminución de temperatura. Los heterocigotas (W/U) forman dos homoduplex (W/W y U/U) y dos heteroduplex (W/U). (B) Los resultados se ilustran en una curva de desnaturalización (fluorescencia normalizada o la derivada de la fluorescencia en función de la temperatura). La detección de mutaciones se realiza mediante la observación de cambios en las formas de las curvas.

El primer paso de este protocolo es la amplificación de la región de interés, utilizando técnicas estándares de PCR, en presencia de un colorante específico para ADN de doble cadena, el cual debe saturar los sitios. Luego de finalizar el paso de PCR, el producto de amplificación se desnaturaliza de forma gradual por pequeños incrementos de temperatura, produciendo un perfil distintivo en la curva de disociación. La separación

de las hebras de ADN provoca la liberación del colorante y así, una disminución en la fluorescencia. A modo de ejemplo en la Figura M1 se muestra la formación de los dúplex y sus correspondientes curvas de disociación, en la cual se puede detectar el cambio de una sola base, puesto que las diferentes secuencias genéticas van a presentar pequeñas variaciones de temperatura de desnaturalización (Figura M1).

Tanto la amplificación de la secuencia blanco como el HRMA se llevó a cabo en el termociclador Rotor-Gene® (RG6000, Corbett Research, UK). Cada reacción consistió en 1X Type-it HRM PCR Kit (Qiagen, Germany), 0,35 µM de ambos cebadores (Tabla M1), y agua libre de ARNasas en un volumen final de 15 µl y utilizando 30 ng de ADN genómico como templado. Las reacciones se incubaron a 95°C por 5 min y luego fueron sujetas a 40 ciclos de una previa desnaturalización de 95°C por 10 seg, un tiempo y temperatura de hibridación específica para cada SNP (Tabla M1), y un paso final de extensión de 72°C por 10 seg. En este último paso se realizó las mediciones ópticas en el canal de HRM. Una vez finalizada la PCR, las curvas de disociación se generaron por un incremento de temperatura de 0,1°C/seg con una rampa específica para cada uno de los SNPs, y se colectaron los datos de la señal de fluorescencia. El análisis de la curva de disociación se realizó con el software Rotor-Gene versión 1.7.27 y el algoritmo provisto por el mismo. Se aplicaron regiones de normalización y un límite de confianza del 90%, los perfiles con identidad menor a 90% se consideraron como perfiles distintos.

Como control de integridad del ADN se utilizaron los resultados obtenidos en la PCR cuyo blanco fue el locus **rs2014683**, cuya sensibilidad fue la menor de todas las PCRs diseñadas. Sólo se incluyeron aquellas muestras con Ct ≤30.

Gen (ID)	Identificador del SNP	Cebador Sentido (5´-3´)	Cebador Antisentido (5´-3´)	Longitud del producto de Amplificación (pb)	Condiciones de Hibridación	Ciclos	Rampa (°C)
ALPP (250)	rs2014683	GATGATGGAGCAAGGGGGTG	CTGTGGGAAAGGGGCACG	59	65°C x 20´´ 62°C x 20´´ 60°C x 20´´	5 5 30	76-87
	rs1048988	TCCTCTGTTCCCAGGTGA	CTGCATGAGCTCAGTGCG	287	58°C x 30´´ 55°C x 30´´	5 35	85-95
ADAM12 (8038)	rs1871054	CTCTCCAGAGTAGCACAGGC	GGCTTGAAGTGTGTGTTGGG	123	64°C x 30´´	40	74-83
	rs11244787	TGCATTGCACACTCGTGAAC	GTATGCATGCTGGAGGGGTT	125	64°C x 30´´	40	77-81.5
MMP2 (4313)	rs243866	CCAAGCCGCAGAGACTTTTCTAGC	GCAATATACTTGTGGGGGGCATTGG	77	70°C x 30´´	35	75-83
	rs243865	ACATTCCCCATATTCCCCACC	TGAGCTGAGACCTGAAGAGC	59	65°C x 20´´ 62°C x 20´´ 60°C x 20´´	5 5 30	70-85
	rs17859821	GAGACGGTTGTCACAGGGAG	CAGTTCCACGAATTCCCCACTC	114	65°C x 30´´ 64°C x 30´´	5 25	78-84
	rs243864	GGTTTTGGCTGGCTTCTTCACTG	GCATTCTCGGTCACAGGATGAG	112	67°C x 30´´	35	76-82
	rs2285053	TTCTATCTCATCCTGTGACCG	AATGAGGCTGAGACCTGCTG	70	65°C x 20´´ 62°C x 20´´ 60°C x 20´´	5 5 30	75-86
MMP9 (4318)	rs3918242	ATTTAGCCAGGCGTGGTGG	CGGCTCACTGCAACATCTGC	101	64°C x 30´´ 63°C x 30´´	10 25	78-89
	rs2234681	FAM- GACTTGGCAGTGGAGACTGCGGGCA	GACCCCACCCCTCCTTGACAGGCAA	>147	67°C x 30´´	30	-

Tabla M1. Oligonucleótidos cebadores utilizados en los ensayos de genotipificación. Se indican la longitud del producto de PCR (pb) para cada uno de los loci, la temperatura (°C), los tiempos (seg) de hibridación y la rampa en la cual se realizó la curva de desnaturalización (°C).

3.9.1.2. Electroforesis capilar para identificación de microsatélites. La electroforesis capilar es una técnica de separación de las diferentes moléculas presentes en una disolución de acuerdo con la relación masa/carga de las mismas. La separación se lleva a cabo en un tubo hueco de diámetro muy pequeño (menos de 50 µm de diámetro), de ahí que reciba el nombre de capilar. Para el caso del ADN, los fragmentos a analizar se encuentran unidos a marcas fluorescentes, siendo detectadas por un láser de argón, que las excita a distintas longitudes de onda, lográndose así el análisis de múltiples fragmentos al mismo tiempo, que se van a mover hacia el polo positivo y se separarán de acuerdo a su longitud en el campo eléctrico: los de menor peso molecular viajarán más rápido a través del capilar, los de mayor peso molecular lo harán más lentamente.

Esta técnica se llevó a cabo para el genotipado del sitio polimórfico correspondiente al microsatélite **rs2234681** ($(CA)_{14-24}$) en el gen *MMP9*. Para ello, se realizó una amplificación por PCR convencional con el cebador sentido marcado radiactivamente con el fluoróforo FAM en el extremo 5´ (Tabla M1). Tanto el cebador sentido como antisentido fueron tomados de Metzger (2012). Finalmente, se procedió con la electroforesis capilar, servicio brindado por Macrogen Inc. (Geumchun-gu, Seoul, Korea). El análisis posterior de los picos fue realizado con Peak Scanner Software v1.0 (Applied Biosystems) y los alelos se agruparon en bajo (L) o alto (H) número de repeticiones CA, según si éstas eran menor a 21 o mayor o igual a 21 (Demacq y col., 2008).

3.9.2. Genotipificación de *CCR2* y *CCR5* con sondas TaqMan®. Las muestras obtenidas de adultos con serología positiva para Chagas (sección Materiales y Métodos 3.1.2.2.) fueron caracterizadas mediante los ensayos comerciales TaqMan® SNP Genotyping (Applied Biosystems), siguiendo las instrucciones del fabricante, diluyendo el ADN hasta una concentración de 30 ng/µl. La amplificación por PCR y la lectura de fluorescencia se llevó a cabo en el equipo StepOne™ (Applied Biosystems).

La tecnología TaqMan puede emplearse para el estudio de SNPs. Esta técnica, de punto final, resulta óptima para estudios que requieran el análisis de muchas muestras para el genotipado de unos pocos SNPs, ya que si bien permite el análisis de un gran volumen de muestras, no es posible el análisis simultáneo de varios SNPs.

Estos experimentos permiten determinar si las muestras desconocidas son: homocigotos A1 o A2 (muestras que sólo tienen el alelo 1, el menos representado, o sólo tienen el alelo 2) u heterocigotos (muestras que tienen el alelo 1 y el alelo 2)

Este ensayo *TaqMan® SNP Genotyping* consta de un solo tubo listo para ser utilizado que contiene: dos cebadores específicos de la secuencia para amplificar el polimorfismo de interés y dos sondas MGB TaqMan® específicas para cada alelo del polimorfismo de interés. Cada una

y un ligando de unión al surco menor (MGB), y que permite el uso sondas más cortas, y de esta forma un genotipado más robusto.

El software realiza la asignación de genotipos automáticamente basandose en los Cts (ciclo en el cual se hace la detección de la fluorescencia) de cada fluorocromo/alelo. Para poder hacer una genotipificación se consideraron requerimientos mínimos:

- Muestras con Cts entre el ciclo 20 y 30;
- Presencia de al menos una muestra homicigota para un alelo y una homocigota para el otro alelo por cada experimento de amplificación (corrida). En los casos donde hubo ausencia de uno de los homocitotas, la genotipificación se realizó de forma manual;
- Las curvas de un genotipo heterocigota deben presentar Cts con menos de 2 Cts de diferencia.

Todos los ensayos de genotipificación fueron realizados en colaboración con la Dra. Clara Isabel González, quien dirige el Grupo de Inmunología y Epidemiología Molecular de la Facultad de Salud, Universidad Industrial de Santander, Colombia. Dicha colaboración se llevó a cabo en el marco de una beca otorgada por la Universidad de las Naciones Unidas, Programa de Biotecnología para Latinoamérica y el Caribe (UNU-BIOLAC) para realizar una pasantía en el año 2014 y bajo el proyecto aprobado por el Programa de cooperación MINCyT–COLCIENCIAS, titulado: "Estudio de asociación de polimorfismos genéticos humanos y cardiopatía chagásica crónica. Comparación entre poblaciones de Colombia y Argentina", a realizarse en los años 2016 y 2017.

3.10. Expresión génica en muestras placentarias

3.10.1. Microarreglo en muestras de placentas de ratones. Cuatro placentas de cada uno de los grupos de animales (VD, K98 y control) se seleccionaron para el análisis transcriptómico. Las muestras de ARN se resuspendieron en etanol y fueron enviadas al servicio de microarreglos de Macrogen (Geumchun-gu, Seoul, Korea). A continuación se detalla el procedimiento:

El ARN fue amplificado y purificado utilizando el Kit TargetAmp-Nano Labeling para el Chip Illumina Expression Bead (EPICENTRE, Madison, EE.UU.), de modo de obtener ARN copia biotinilado, siguiendo las instrucciones del fabricante: 500 ng de ARN total se transcribió de forma reversa a ADN copia con el cebador T7 oligo(dT). La segunda hebra de ADN copia se sintetizó y se transcribió *in vitro* con biotina-NTP. Luego de la purificación del ARN copia se cuantificó mediante el espectrofotómetro ND-1000 (NanoDrop, Wilmington, EE.UU.), 1.500 ng de ARN copia marcado se hibridaron con el microarreglo Mouse WG-6 v3.0 Expression Beadchip (Illumina) por 17 horas a 58°C, según las instrucciones del fabricante (Illumina, Inc., San Diego, EE.UU.). La detección de la señal se llevó a cabo con streptavidina-Cy3 (GE Healthcare Bio-Sciences, Little Chalfont, Reino Unido) siguiendo el manual. Los arreglos fueron escaneados con el escáner confocal Illumina Bead Array Reader. La calidad de la hibridización y el rendimiento del chip fueron monitoreados mediante inspección visual tanto del control de calidad interno y los datos crudos escaneados, los cuales fueron extraídos usando el software provisto por el fabricante (Illumina Genome Studio v2011.1 (Gene Expression Module v1.9.0)).

3.10.2. PCRs en tiempo real para evaluar expresión génica. La validación del microarreglo se realizó en las muestras usadas en dicho ensayo y en cuatro muestras independientes por cada grupo por RT-qPCR. Se seleccionaron 22 genes que se encontraron diferencialmente expresados en la respuesta a la infección con *T. cruzi* (*Ccl3, Ccl4, Ccl7, Cd274, Cd3d, Cd74, Cd8b1, Cxcl1, Gbp2, Gbp3, Gbp6, H2-Aa, H2-Eb1, Hbb-γ, Edn2, Igtp, Irgb10, Irgm1, Ppbp, S100A9* y *Serpina5*).

Las RT-qPCR se llevaron a cabo en el equipo 7500 Real-Time PCR System (Applied Biosystems), con una mezcla de reacción de volumen final 15 µL (1X FastStart Universal SYBR Green Master, cada oligonucleótido en una concentración de 100 µM y 4 µL de

templado en una dilución 1/100). Las condiciones de ciclado fueron: 15 min de pre-incubación a 95°C, 40 ciclos de 95°C durante 30 seg de desnaturalización seguida de 1 min de hibridación y extensión a la temperatura correspondiente (Tabla M2) y la fluorescencia se leyó al final de cada ciclo. Una vez finalizada la reacción de PCR se realizó una curva de desnaturalización de los amplicones que consiste en una etapa inicial de desnaturalización de 15 seg a 95°C, seguida por un incremento gradual en la temperatura de 0,1°C/seg de 65-95°C.

Gen	Refseq_NM	Cebador Sentido (5'->3')	Cebador Antisentido (5'->3')	Hibrida-ción (°C)
Ccl3	NM_011337.2	CCATATGGAGCTGACACCCC	TCAGGAAAATGACACCTGGCT	63
Ccl4	NM_013653.2	CCAGGGTTCTCAGCACCAAT	TCAGGAATACCACAGCTGGC	63
Ccl7	NM_013654	CGCTGCTTTCAGCATCCAAG	CTTGAAGATAACAGCTTCCCAGG	63
Cd274	NM_021893.2	TTCACAGCCTGCTGTCACTT	TAAGGTCCTCCTCTCCTGCC	63
Cd3d	NM_013487.1	ATTGCTGTTCTCCCCCAAGG	AACCATCCTTCCACCGTTCC	63
Cd74	NM_010545.3	GGCTCCACCTAAAGAGCCAC	GGGTGACTTGACCCAGTTCC	63
Cd8b1	NM_009858.2	CCTGACATGCAGCCTTACCA	CTCTCCTCCGCACACAGTAA	63
Cxcl1	NM_008176.1	CTGGGATTCACCTCA	CAGGGTCAAGGCAAG	64
Edn2	NM_007903.2	TGTGCTACCTTCTGCCATCG	TGAGATATCCCTCAGCTTTCGG	58
Gbp2	NM_010260.1	CCAAGAAGGCAGGGCAAACC	CCGTCACATAGTGCAGCTGGT	63
Gbp3	NM_018734.3	AGTAGTGTTCCCTGGGTTCTG	AAACCAACAATGGCCACCACC	63
Gbp6	NM_145545.2	CAGCAAGCCCAAGTTCACAC	GGCGAAGATCCACGAGTCAT	58
Gzmg	NM_010375.2	CTGGAGCAGAGGAGATCATCG	ATGTCATTGGTGCCATGCTTT	58
Hbb-y	NM_008221.4	TCCTGTGATCACCAGCAACC	TGGCAGAAGCAGAGGACAAG	58
H2-Aa	NM_010378.2	TACCAATGAGGCTCCTCAAGC	CGTCTGCGACTGACTTGCTA	63
H2-Eb1	NM_010383.2	CGGTCGAGTGGAAAGCACAA	AAGTAGATGAACAGCCCCGC	63
Igtp	NM_018738.4	TCTCTCTCCTGACCGTCCTG	GTGCTCCTCGGCTTCTTTCT	58
Irgb10	XM_905096.3	GTGGTCCATGTCTGTGGAGG	ATTCGGCTCACTTGACAGCA	58
Irgm1	NM_008326.1	ATAACTCCTCTGGATCAGGGTTT	CTCAGGTTCTTCCTCCACTCT	58
Ppbp	NM_023785.3	TGGCTCTGGGGACAGTTCTA	AGGTTATGAAGTGGGCAGGC	63
S100a9	NM_009114.1	GGAGGACCTGGACACAAACC	TACTTCCCACAGCCTTTGCC	58
Serpina5	NM_172953.1	GACGGCCTTCAGTGAGACAA	ACCTGCTTCATCTTGCCCTC	58

Tabla M2. Secuencias de oligonucleótidos y temperaturas de hibridación para las RT-qPCRs utilizadas en la validación del microarreglo con muestras de los ratones.

La placenta murina se fijó en formaldehído al 10% en tampón de fosfato 0,1 M (pH 7,3) durante 24 horas, luego se deshidrató en alcohol, se clarificó en xileno, se embebió en parafina y se seccionó a 5 µm. Las secciones histológicas de parafina se

tiñeron con hematoxilina-eosina para análisis histológico rutinario gentilmente realizado por la Dra. Ulrike Kemmerling.

3.11. Análisis de datos

3.12.1. Asociación de polimorfismos y fenotipo. Dos fenotipos fueron estudiados en el marco de esta tesis: presencia de infección congénita en las muestras de niños y recién nacidos de madres con serología positiva para Chagas y, la detección de cardiopatía por diagnóstico de electrocardiograma en pacientes adultos con serología positiva para Chagas.

En primer lugar se evaluó si las poblaciones de estudio se encontraban en equilibrio de Hardy - Weinberg (HWE) para cada uno de los sitios polimórficos estudiados mediante el uso del software Haploview versión 4.1 (Barrett y col., 2005).

Las frecuencias, su asociación con los fenotipos estudiados, las razones de probabilidades o ORs (del inglés *odds ratio*) y los intervalos de confianza del 95 % ($IC_{95\ \%}$) se calcularon utilizando el software PLINK V1.07 (Purcell y col., 2007). Con este mismo programa, se evaluó el efecto genético de cada polimorfismo en el fenotipo mediante un modelo de regresión lineal logística de casos y controles como las variables dependientes incluyéndose el género como co-variable. Este tipo de modelo que tiene en cuenta la tabla completa de los tres genotipos (A_1A_1, A_1A_2 y A_2A_2) se conoce como codominante o de 2 grados de libertad. Básicamente el modelo asume que puede haber un riesgo distinto de los individuos heterocigotos y homocigotos mutantes respecto a los homocigotos normales. Para algunas enfermedades complejas se puede asumir que el efecto para los individuos heterocigotos es la mitad que para los homocigotos con menor frecuencia. Este modelo se conoce como modelo aditivo y se puede analizar mediante un test de tendencia lineal (en este caso el de Mantel-Haenszel que se utiliza en epidemiología tradicional) que se conoce en genética como test de Cochran-Armitage. La hipótesis nula en este caso es que la pendiente para la recta que relaciona el riesgo y los tres genotipos es cero. Este modelo también se conoce como modelo multiplicativo ya que modela los efectos en la escala de odds. Una ventaja importante de este modelo es que no necesita que se cumpla Equilibrio de Hardy-Weinberg, así que puede ser una opción cuando esta hipótesis no se puede validar en la población. Por último, también

utilizando el software PLINK V1.07, se analizó si los distintos alelos se encontraban asociados al fenotipo asumiendo dos modelos de herencia: dominante (homocigota predominante vs heterocigota + homocigota minoritario) o recesivo (homocigota predominante + heterocigota vs homocigota minoritario).

Con el software Haploview (v.4.1) se llevó a cabo la determinación de presencia de desequilibrio de ligamiento (LD) y se estimaron los coeficientes de correlación al cuadrado. Se identificaron los bloques y la asociación de cada haplotipo con cada uno de los fenotipos.

Para la caracterización de las interacciones génicas, se aplicó el software libre de minería de datos MDR (versión 3.0) (Hahn y col, 2003). La precisión de cada modelo se evaluó mediante un clasificador de Bayes en el contexto de una validación cruzada de 10 veces. La significación estadística se evaluó usando una prueba de 1000 permutaciones. Los mejores modelos en todas las combinaciones posibles se definieron por 1) test de precisión balanceado (BTA): precisión de la clasificación, calculado a partir del subconjunto de datos de prueba, 2) consistencia en la validación cruzada (CVC): número de veces que un determinado modelo, el cual fue obtenido a partir del total de los datos, se vuelve a obtener al utilizar 10 subconjuntos al azar de dichos datos, y 3) el nivel de significación.

Por último, la ganancia de información (information gain, IG) también se evaluó por el método de MDR. Este es un concepto importante en la minería de datos y se basa en la medición de la entropía: cuánta entropía se remueve del estado de caso-control considerando los genotipos, combinando dos o más SNPs, en otras palabras: cuánta información se gana de la combinación con respecto a los SNPs individuales. La IG selecciona combinaciones significativas de variables sobre la base de la entropía (Hahn y col., 2003): valores de entropía positivos indican interacción sinérgica mientras que los valores negativos indican redundancia.

3.12.2. Análisis de los datos del microarreglo. Determinación y anotación de genes diferencialmente espresados (DEGs). La significancia estadística de los datos de expresión se determinó usando el test LPE (del inglés *Local Pooled Error*) y el cambio relativo en el cual la hipótesis nula fue de no diferencia entre grupos. La tasa de falso descubrimiento o FDR (del inglés false discovery rate) se controló ajustando el valor p

usando el algoritmo de Benjamini-Hochberg. Para los DEGs, se realizó análisis del "clusters" jerárquico, usando ligamiento completo y distancia euclídea como medida de similitud. El enriquecimiento génico y la anotación funcional se llevaron a cabo con DAVID (http://david.abcc.ncifcrf.gov/home.jsp). Todos los datos y la visualización de los genes diferencialmente expresados se analizaron con el software R (ver 3.1.2) (http://www.r-project.org).

Todos los datos obtenidos en el microarreglo fueron depositados en la base *"Gene Expression Omnibus"* (GEO) del NCBI para que sea de acceso público con el código de acceso GSE85996 (http://www.ncbi.nlm.nih.gov/geo/query/acc.cgi?acc=GSE85996).

Detección de vías diferencialmente expresadas. Dos enfoques diferentes fueron utilizados para determinar las vías involucradas (Khatri y col., 2012):

1) **Análisis de Sobre-Representación.** Este análisis estadístico detecta interacciones génicas y proteicas evaluando la fracción de genes en una vía en particular dentro solo del conjunto de genes que presenta cambios en la expresión (FC > |1,5|). Este análisis se realizó con el servicio de predicción de funciones génicas gratuito de libre acceso GeneMANIA (http://genemania.org/).

2) **Análisis de Clase Funcional por Puntuación**. Evalúa cambios pequeños en conjuntos predeterminados de genes, para identificar enriquecimiento significativo de los efectos a nivel de vías. Para este enfoque se usó el software GSEA (del inglés *Gene Set Enrichment Analysis*) (Subramanian y col., 2005; Mootha y col., 2003) aplicando la base de datos de Ontología de Procesos Biológicos de Gene Ontology (GO). Se tomaron los siguientes parámetros:

- NES (del inglés *Normalized Enrichment Score*): Grado en el cual cada conjunto de genes está sobre-representado al comienzo o al final de una lista ordenada de genes en el conjunto de datos de expresión, luego de una normalización a través de todos los conjuntos génicos analizados.
- Valor q del FDR: La probabilidad estimada de que la puntuación del enriquecimiento normalizado represente un falso positivo.

La herramienta de integración de redes ampliamente utilizada y de gran escala, Cytoscape (Shannon y col., 2003) fue utilizada para la visualización de ambos enfoques.

3.12.3. Análisis estadísticos de variables cuantitativas. Tanto la estadística descriptiva como los distintos test empleados se llevaron a cabo con GraphPad Prism 4.0 (GraphPad Software, Inc., http://graphpad.com/quickcalcs.cfm). En comparaciones de dos grupos se empleó el test no paramétrico Mann-Whitney, mientras que en las comparaciones con más de dos grupos se evaluó mediante ANOVA de un factor no paramétrico o de dos factores utilizando el test de múltiples comparaciones de Sidak. Valores de $p<0,05$ fueron considerados estadísticamente significativos.

RESULTADOS

R 1

Expresión génica en el microambiente placentario en modelo experimental de infección crónica con distintos genotipos de *T. cruzi*

1. Microarreglo para identificación de genes diferencialmente expresados

A pesar de que no se ha encontrado una asociación entre las distintas UDTs y la transmisión materno-fetal, se ha observado que existe cierta selección natural de las poblaciones parasitarias durante la infección congénita (Burgos y col., 2007; Ortiz y col., 2012; Llewellyn y col., 2015). Siendo la placenta el órgano clave que debe enfrentar *T. cruzi* para alcanzar el feto y del cual la transmisión depende, el conocimiento de los eventos que ocurren en el ambiente placentario es fundamental para la comprensión de la infección congénita.

En el presente trabajo se ha estudiado la expresión génica diferencial del microambiente placentario mediante un enfoque transcriptómico de microarreglo en un modelo murino durante la infección con dos cepas de *T. cruzi*. Una de estas cepas fue VD (TcVI) la cual ha sido aislada de un caso de infección congénita, altamente mortal en ratones (Risso y col., 2004; Dolcini y col., 2008). La otra cepa utilizada fue K98 (TcI). Ha sido descripto que esta cepa en ratones produce infiltrados inflamatorios y resorciones durante el embarazo, pero no causa transmisión congénita (Solana y col. 2002). Para este análisis de expresión génica, se utilizaron muestras de ARN total obtenido de placentas de hembras de animales C57Bl/6J cursando el día 18,5 ± 1 de gestación infectadas de forma crónica con la cepa VD (n = 4), o con la cepa K98 (n = 4) y control sin infección (n = 4).

Los resultados del microarreglo fueron depositados en el sitio del *National Center for Biotechnology Information (NCBI) Gene Expression Omnibus (GEO)* (http://www.ncbi.nlm.nih.gov/geo/query/acc.cgi?acc=GSE85996).

1.1. Análisis jerárquico de agrupamiento en las muestras de estudio

Este análisis exploratorio fue utilizado para comprobar cómo se agrupaban las muestras de los diferentes grupos. Como se puede ver en la representación de la Figura R1, la agrupación jerárquica de genes presenta reproducibilidad de la expresión génica dentro de los 3 grupos estudiados (VD, K98 y control). Se observó también una importante

regulación positiva en la mayoría de genes en el grupo VD mientras que, por el contrario, en K98 se vio una mayor regulación negativa.

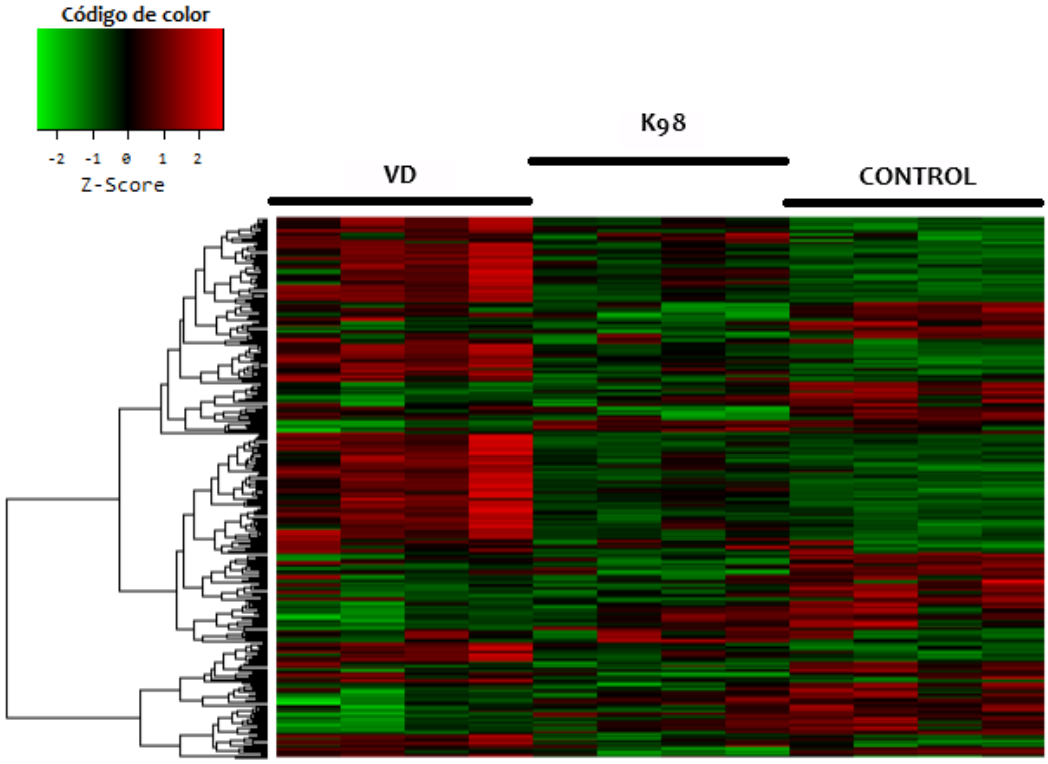


Figura R1. Representación 2D de la matriz de expresión (*heatmap*).

Las filas representan los genes y las columnas las condiciones. Cada nivel de expresión se representa con un color en la posición correspondiente a su gen y su condición. El color depende del nivel de expresión: de verde (baja expresión) a negro (expresión media) y a rojo (alta expresión).

1.2. Genes diferencialmente expresados

Con los resultados obtenidos a partir del microarreglo, se detectaron 247 genes diferencialmente expresados (DEGs, del inglés *differential expressed genes*) con un incremento relativo (FC, del inglés *fold change*) ≥ l1,5l y un nivel de significación ≤ 0,05 comparando los grupos infectados (K98 y VD) con respecto al control sin infección. De estos, se detectaron 140 genes regulados positivamente y 107 de forma negativa (Figura R2). El mayor cambio se observó para el grupo VD en el gen *Cxcl9* (FC = 17,03), un quimioatractante de células T que es inducido por interferón gamma (IFN-γ), mientras que el

gen que presentó una mayor diferencia negativa en su expresión con respecto al control fue en K98 *Tph1* (FC = -9,92), el cual codifica para una isoenzima de la hidrolasa de triptófano.

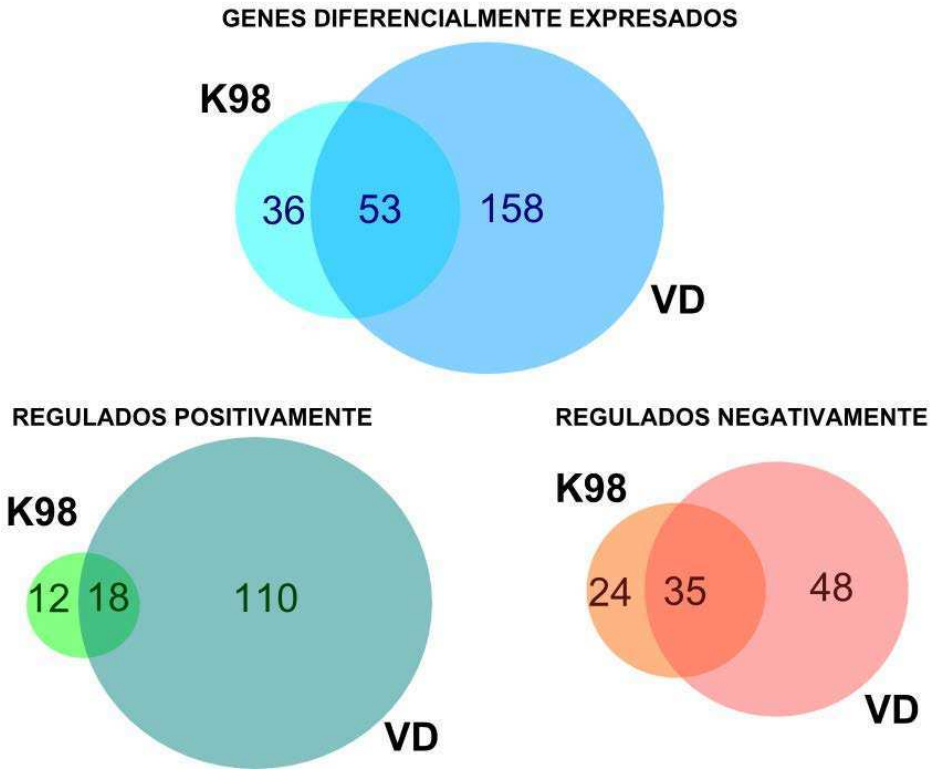


Figura R2. Número de genes expresados diferencialmente.

Se representa en diagramas de Venn el total de genes diferencialmente expresados en cada condición comparando con el control sin infección. La intersección indica los genes compartidos por ambos grupos.

Una mayor respuesta de la expresión génica se observó en VD, con 211 DEGs, mientras que en K98 sólo 89, de los cuales 53 son compartidos, entre los que se pueden mencionar *Ccl5*, *Ccl4*, *Tph1*, *Cxcl14*, *Gzmd* y *Gzmg* (Anexo Tabla A1). Esta mayor respuesta generada en la infección con la cepa VD, podría ser producto de los niveles más elevados observados en la infección del microambiente placentario en comparación con K98. Es interesante destacar que en la infección con VD, sólo un 39% de los DEGs tuvieron regulación negativa, mientras que en K98 este porcentaje fue de 69%. Por lo tanto, el efecto de la infección fue opuesto entre las dos cepas: en K98 produjo una mayoría de genes que

disminuyeron su transcripción, mientras que en VD la mayoría de los genes se transcribieron más activamente.

Con la finalidad de estudiar las interacciones proteicas se realizaron análisis bajo dos enfoques; un primer enfoque de primera generación conocido como Análisis de Sobre-Representación y otro de segunda generación llamado Clase Funcional por Puntuación.

1.3. Análisis de Sobre-Representación

Este enfoque evalúa estadísticamente la fracción de genes en una vía particular sólo tomando en cuenta los genes que mostraron cambios en su expresión, siendo los genes seleccionados aquellos con un FC ≥ l1,5l con respecto al control sin infección. Este análisis se realizó utilizando el servicio de predicción de funciones génicas de acceso libre y gratuito GeneMANIA y la herramienta de visualización e integración de redes Cytoscape, ampliamente utilizada y de gran escala. La co-localización, co-expresión, vías y dominios compartidos e interacciones genéticas, físicas y predichas de estos DEGs para ambos grupos (K98 y VD) se muestran en la Figura R3 y Anexo Tabla A2.

De este análisis una de las vías que resultaron significativas y reguladas negativamente tanto en el grupo K98 como en VD ha sido la del "Gránulo Secretorio" (q-valor = 0,02) (Figura R4). Dentro de esta vía, la transcripción de los genes *Serpina5* (FC_{VD} = -1,77, FC_{K98} = -2,04), *Gzmd* (FC_{VD} = -2,15, FC_{K98} = -3,44), *Gzmg* (FC_{VD} = -2,16, FC_{K98} = -3,14) y *Scgb1a1* (FC_{VD} = -2,45, FC_{K98} = -2,53) se vio afectada negativamente por infección con *T. cruzi* sin depender de la cepa mientras que el gen *Il-1β* resultó tener sobre-expresión en los animales infectados con VD (FC_{VD} = 2,47, p < 0,0001) (Anexo Tabla A1). La proteína IL-1β es producida en macrófagos activados, que actúa como mediadora de la respuesta inflamatoria y está involucrada en una variedad de actividades celulares, incluyendo proliferación celular, diferenciación y apoptosis. En cambio, el gen *Cuzd1,* importante durante las últimas etapas del embarazo, estuvo regulado negativamente en K98 (FC_{K98} = -2,58, p = 0,019) pero no se vio afectada su transcripción durante la infección con VD (Anexo Tabla A1).

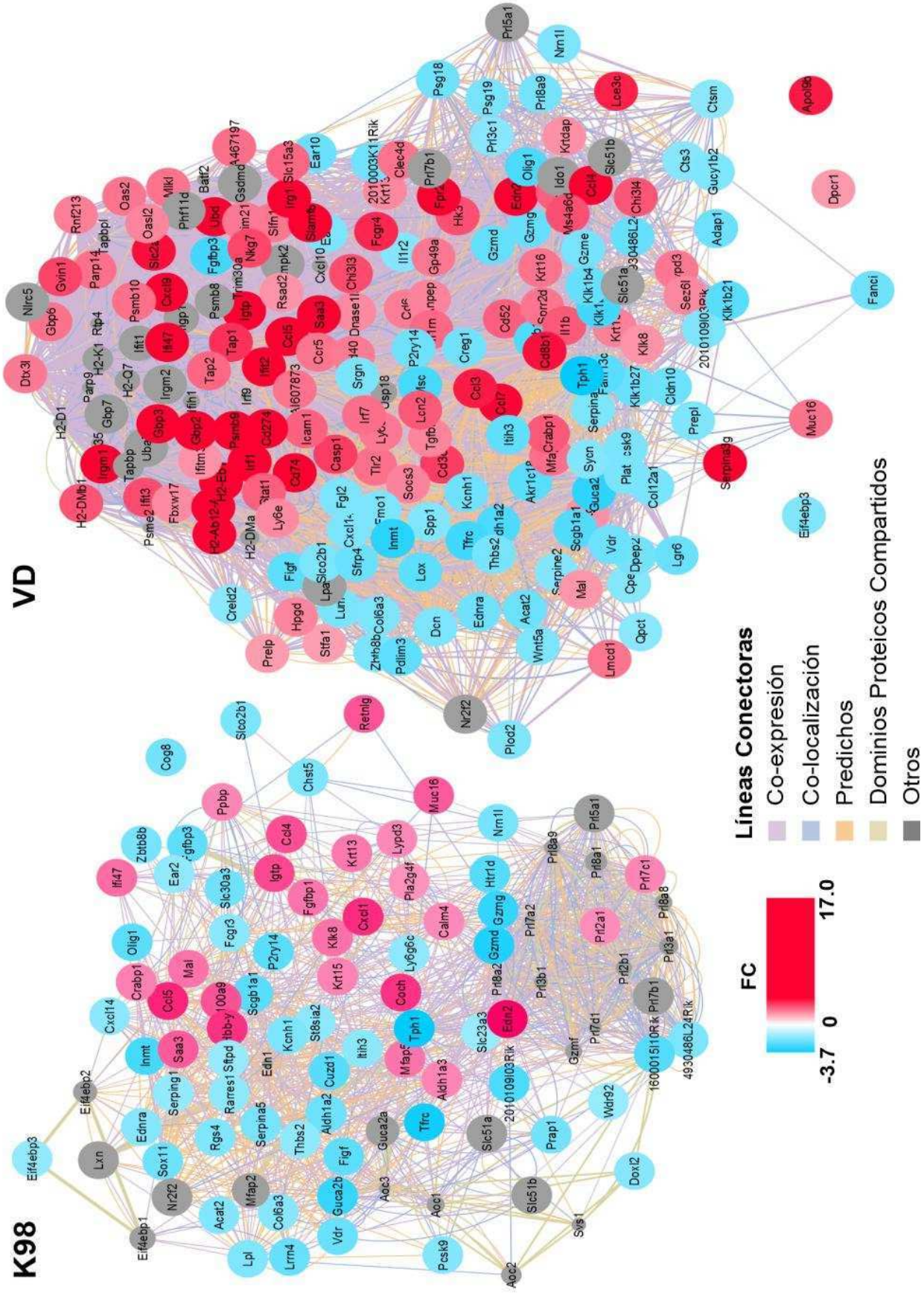

K98
VD
Líneas Conectoras
Co-expresión
Co-localización
Predichos
Dominios Proteicos Compartidos
Otros
FC
17.0
0
-3.7

Figura R3. Redes de interacción para DEGs predichas por GeneMANIA y visualizadas en Cytoscape. Los genes/proteínas están representados por círculos e indicados por el esquema de colores, donde el gradiente de rojo corresponde a FC > 1,5, el gradiente de celeste corresponde a FC < - 1,5 y los círculos grises son otros genes/proteínas relacionados a los DEGs pero que no se encontraron en el microarreglo. Las relaciones entre los genes/proteínas se muestran como líneas conectoras.

Como se muestra en la Figura R4, dentro de los primeros tres procesos detectados en el análisis de los DEGs correspondientes al grupo VD, se encuentran aquellos relacionados a la respuesta inmune, los cuales no resultaron significativos en el grupo K98, por ejemplo, "Respuesta a Interferón gamma" (q-valor = $2{,}40 \times 10^{-2}$) y "Respuesta Inmune Innata" (q-valor = $4{,}90 \times 10^{-2}$). Dentro de los 5 procesos con mayor significancia también se encontraron "Procesamiento y Presentación Antigénica" (q-valor = $1{,}85 \times 10^{-4}$) y "Respuesta a Interferón-beta" (q-valor = $3{,}17 \times 10^{-3}$) (Anexo Tabla A2). Las primeras tres vías comparten los genes *H2-Aa, H2-Ab1, H2-Eb1*, mientras que las vías de respuesta a IFN-γ y IFN-β comparten también varios genes: *Gbp2, Gbp3, Gbp6, Irf1, Irg1, Ifitm3* y *Stat1.* Los once genes relacionados a la vía de respuesta a IFN-γ tuvieron un mayor nivel de transcripción en el grupo VD comparando con el grupo control no infectado (Tabla R1). El único gen relativo a esta vía con un FC positivo común a los dos grupos de infección fue *Ccl5* ($FC_{K98} = 3{,}11$; $p < 0{,}0001$ y $FC_{VD} = 8{,}57$; $p < 0{,}0001$) (Anexo Tabla A1), mostrando así un efecto claramente distinto de cada cepa en este proceso.

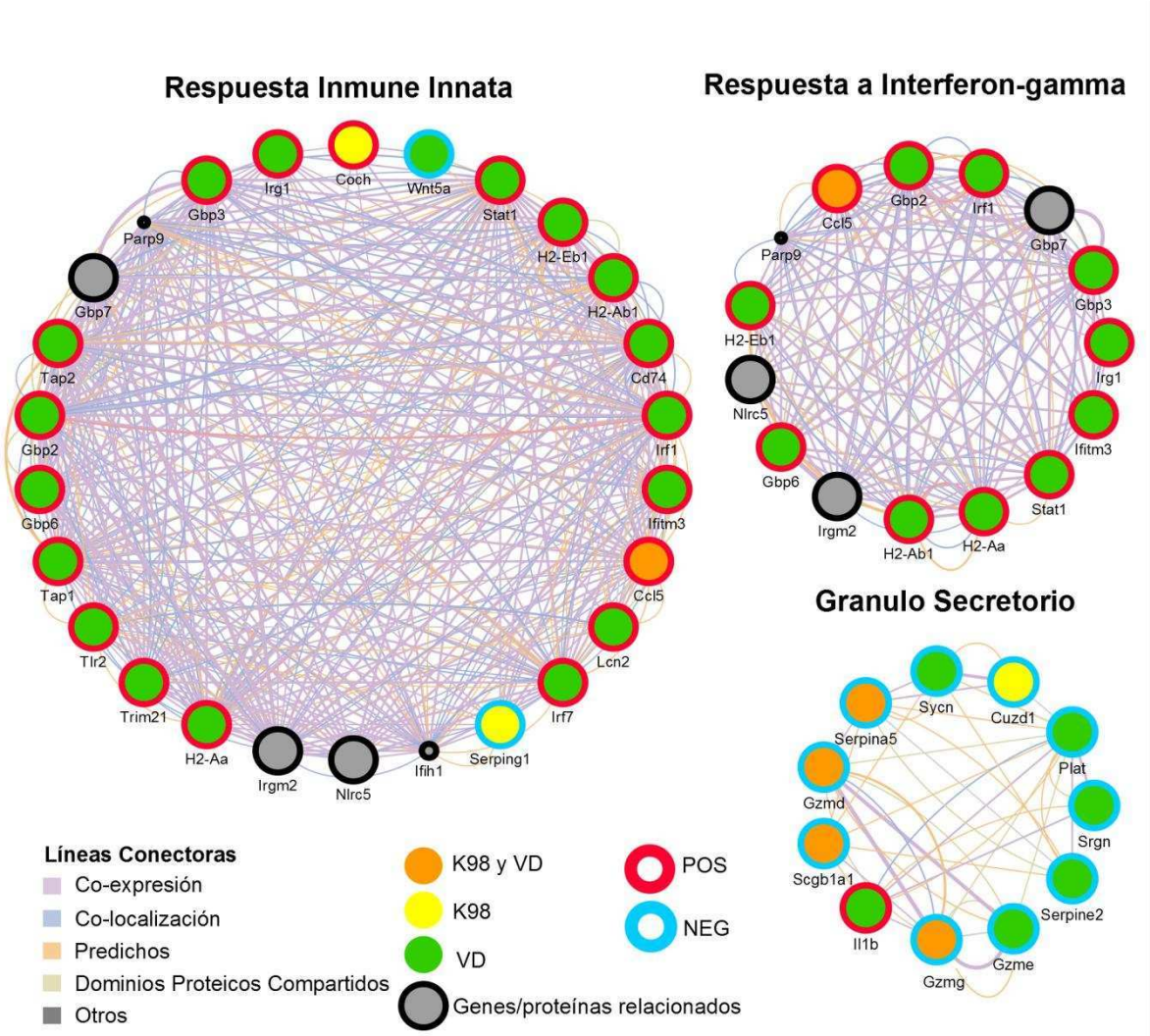


Figura R4. Visualización de tres vías predichas por GeneMANIA a partir de los DEGs: "Respuesta Inmune Innata", "Respuesta a Interferón-gamma" y "Gránulo Secretorio".

Los genes/proteínas están representados como círculos de colores, donde amarillo indica un DEGs correspondiente al grupo K98, verde a VD y naranja a ambos. El color de la línea del borde de cada círculo indica regulación positiva (rojo) o negativa (celeste), mientras que los círculos grises con borde negro son genes/proteínas relacionados a estos DEGs pero no detectados en el microarreglo. Las relaciones experimentales entre los genes/proteínas se muestran como líneas conectoras.

Gen	FC	P
H2-Aa	3,76	<0,0001
H2-Ab1	3,67	<0,0001
H2-Eb1	4,74	<0,0001
Gbp2	7,55	<0,0001
Gbp3	4,28	<0,0001
Gbp6	2,12	0,0001
Irf1	3,89	<0,0001
Irg1	6,51	<0,0001
Ifitm3	1,68	0,009
Stat1	2,38	<0,0001

Tabla R1. Valores de *fold change* (FC) y valores p de los genes de la vía de IFN-γ sobre-expresados en el grupo VD con respecto al control.

Más aún, la vía de "Respuesta Inmune Innata" también mostró una regulación positiva de la mayoría de los genes en el grupo VD. Dos genes tuvieron una tasa de transcripción negativa con respecto al control: en el grupo VD el gen *Wnt5a* (FC_{VD} = -1,80; p = 0,010) (Anexo Tabla A1), el cual está implicado en varios procesos de desarrollo, incluyendo la regulación del destino celular y embriogénesis; en el grupo K98 el gen *Serping1* con un FC_{K98} = -1,63 (p = 0,040) (Anexo Tabla A1). Este gen codifica una proteína plasmática altamente glicosilada involucrada en la regulación de la cascada del complemento.

1.4. Análisis de Clase Funcional por Puntuación

Otra aproximación que se empleó es el algoritmo de Análisis de Enriquecimiento en Conjunto de Genes (GSEA, por el inglés *Gene Set Enrichment Analysis*), el cual detecta pequeños cambios en un conjunto de genes predeterminados, para identificar los efectos en enriquecimientos significativos a nivel de vías (abordaje de clase funcional por puntuación). El resultado primario de este análisis de enriquecimiento de conjuntos de genes es la puntuación de enriquecimiento (ES), que refleja el grado en que un conjunto de genes está sobre-representado en la parte superior o inferior de una lista clasificada de genes. GSEA calcula el ES recorriendo esta lista de genes, aumentándolo cuando un gen está dentro del

conjunto de genes y disminuyéndolo cuando no lo está. La magnitud del incremento depende de la correlación del gen con el fenotipo.

La Figura R5 muestra dos ejemplos diferentes de la gráfica de enriquecimiento, la cual facilita la comprensión de los resultados del análisis. La parte superior de la misma muestra el ES (línea verde, Figura R5) del conjunto de genes a medida que el análisis se desplaza por la lista ordenada de genes (barras negras, Figura R5). La puntuación para ese conjunto corresponderá al valor máximo absoluto que alcanza el ES (asterisco naranja, Figura R5). El subconjunto de genes que más contribuye al ES es aquel que está a la izquierda (ES positivo) o derecha (ES negativo) del pico del gráfico. La parte inferior del gráfico muestra el valor de la métrica de clasificación, en la cual la magnitud del ES depende de la correlación del gen con el fenotipo, a medida que se desplaza en la lista.

A. **B.**

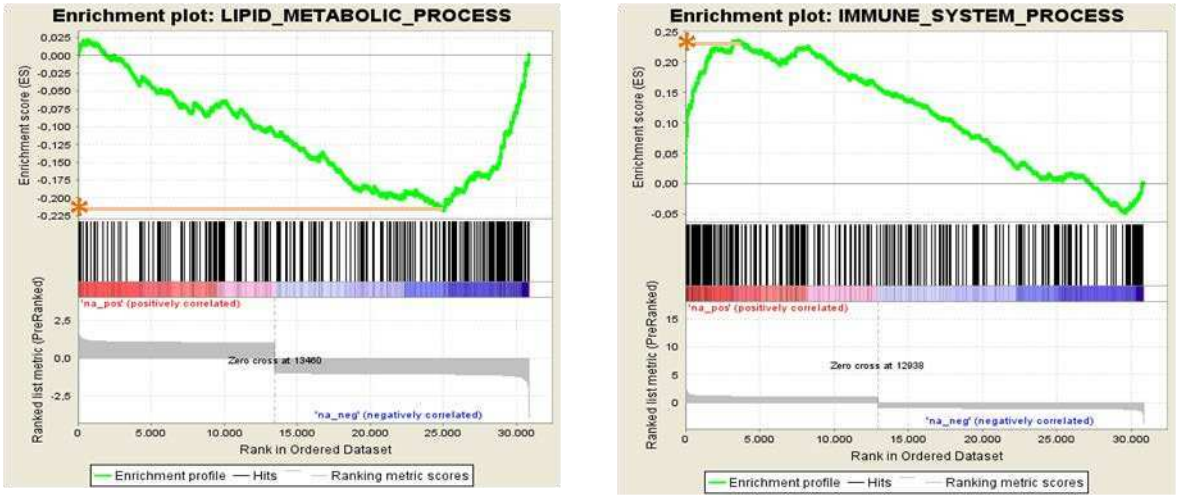


Figura R5: Resultados del análisis por GSEA.

Ejemplos de diagramas de enriquecimiento obtenidos a partir del software GSEA: vía sub-representada (A) y sobre-representada (B).

La base de datos utilizada para llevar a cabo el GSEA fue la de Procesos Biológicos Ontológicos correspondiente a GO. Se tuvieron en cuenta dos parámetros, 1) la puntuación de enriquecimiento normalizada (NES, del inglés *Normalized Enrichment Score*) que es el grado en el cual cada conjunto génico está sobre-representado en la parte superior o inferior

de la lista de genes en la base de datos de expresión del microarreglo, después de normalizar con el conjunto de genes analizados; y 2) q- valor de la tasa de falsos positivos (FDR, del inglés *False Discovery Rate*) que es que la probabilidad estimada de que el NES represente un falso positivo.

De esta forma, se encontraron varias vías involucradas en procesos metabólicos y de transporte macromolecular que resultaron estar reguladas negativamente en ambos grupos de infección (Figura R6 y Anexo Tabla A3). Dentro de los procesos metabólicos, se encuentran la vía de "Procesos de Metabolismos de Lípidos" (NES_{K98} = -3,79, NES_{VD} = -3.42,), "Procesos de Metabolismos de Carbohidratos" (NES_{K98} = -3,55 y NES_{VD} = -3,46) y "Proteolisis" (NES_{K98} = -2,96 y NES_{VD} = -2,86). Todas estas vías tuvieron valores de FDR.q.val <0,0001 para ambas cepas.

La vía de "Transporte Intracelular" fue uno de los procesos regulados de forma negativa dentro de los procesos de transporte (NES_{K98} = -1,99 y $FDR.q.val_{K98}$ = 0,003; NES_{VD} = -2,8 y $FDR.q.val_{VD}$ = 0,0001). La transcripción también fue afectada negativamente por la infección, siendo algunas de las vías representadas la "Regulación de la Transcripción ADN-dependiente" (NES_{K98}= -2,67 y $FDR.q.val_{K98}$ = 0,001; VD: NES = -2,01 y FDR.q.val = 0,022) y la "Regulación de procesos del metabolismo de ARN" (K98: NES_{K98} = -2,67 y $FDR.q.val_{K98}$ = 0,001; VD: NES = -2,13 y FDR.q.val = 0,013).

Así mismo, se observó una regulación negativa del proceso de muerte celular en ambos grupos de infección, siendo dos los procesos representados: "Regulación de la Muerte Celular Programada" (K98: NES_{K98} = -1,80 y $FDR.q.val_{K98}$ = 0,057; VD: NES = -2,18 y FDR.q.val = 0,011) y "Regulación de la apoptosis" (K98: NES_{K98} = -1,80 y $FDR.q.val_{K98}$ = 0,058; VD: NES = -2,20 y FDR.q.val = 0,010).

Como muestra la Figura R6, se detectó una marcada regulación positiva de procesos relacionados con respuesta inmune y respuesta a estímulos externos. Dentro de los primeros en la infección con ambas cepas se encuentran "Procesos del Sistema Inmune" (K98: NES_{K98} = 2,05 y $FDR.q.val_{K98}$ = 0,049; NES_{VD} = 4,15 y $FDR.q.val_{VD}$ = 0,0001) (Figura R6) y "Respuesta Inflamatoria" (K98: NES_{K98} = 2,28 y $FDR.q.val_{K98}$ = 0,018; NES_{VD} = 4,25 y

FDR.q.val$_{VD}$ < 0,0001) (Figura R6). Sin embargo, la regulación positiva de la respuesta inmune fue diferencial para el grupo VD respecto al control, como lo muestran las vías relacionadas a "Activación Leucocitaria" (NES$_{VD}$ = 2,48 y FDR.q.val$_{VD}$ = 0,006), "Activación Celular" (NES$_{VD}$ = 2,43 y FDR.q.val$_{VD}$ = 0,008) y "Activación Linfocitaria" (NES$_{VD}$ = 2,38 y FDR.q.val$_{VD}$ = 0,009), mientras que en el grupo K98 no se encontraron tales diferencias. En el caso de las vías relacionadas con respuesta a estímulos externos, se observaron resultados opuestos en "Procesos de Multi-organismos", que se encontró regulado positivamente en VD (NES$_{VD}$ = 2,70 y FDR.q.val$_{VD}$ = 0,002) y negativamente en K98 (NES$_{K98}$ = -1,77 y FDR.q.val $_{K98}$ = 0,065) y "Respuesta de Defensa Celular" también fue una vía sobre-representada en VD (NES$_{VD}$ = 3,29 y FDR.q.val$_{VD}$ <0,0001) pero no en el grupo K98.

Ciertas vías relacionadas con homeostasis resultaron tener diferencias en su representación dentro de ambos grupos de infección. Por ejemplo, el NES para "Procesos Homeostáticos" fue negativo en K98 en el límite de significancia (NES $_{K98}$ = -1,85 y FDR.q.val $_{K98}$ = 0,05), mientras que fue positivo en VD (NES$_{VD}$ = 2,41 y FDR.q.val$_{VD}$ = 0,0085).

Otros conjuntos de genes con una representación diferencial fueron algunos relacionados con las vías de señalización: "Vía de Señalización de Receptores Acoplados a Proteína G" (NES $_{K98}$ = -2,02 y FDR.q.val $_{K98}$ = 0,027; NES$_{VD}$ = 2,683 y FDR.q.val$_{VD}$ = 0,003) y "Cascada de Protein Quinasa" (NES $_{K98}$ = -1,55 y FDR.q.val $_{K98}$ = 0,146; NES$_{VD}$ = 2,338 y FDR.q.val$_{VD}$ = 0,010). Finalmente, el proceso biológico de "Señalización Célula-Célula" se encontró regulado negativamente en K98 pero regulado positivamente en VD (NES $_{K98}$ = -2,42 y FDR.q.val $_{K98}$ = 0,004; NES$_{VD}$ = 2,46 y FDR.q.val$_{VD}$ = 0,007) así como también los "Procesos de Regulación Negativa del desarrollo" (NES $_{K98}$ = -1,62 y FDR.q.val $_{K98}$ = 0,114; NES$_{VD}$ = 2,22 y FDR.q.val$_{VD}$ = 0,016).

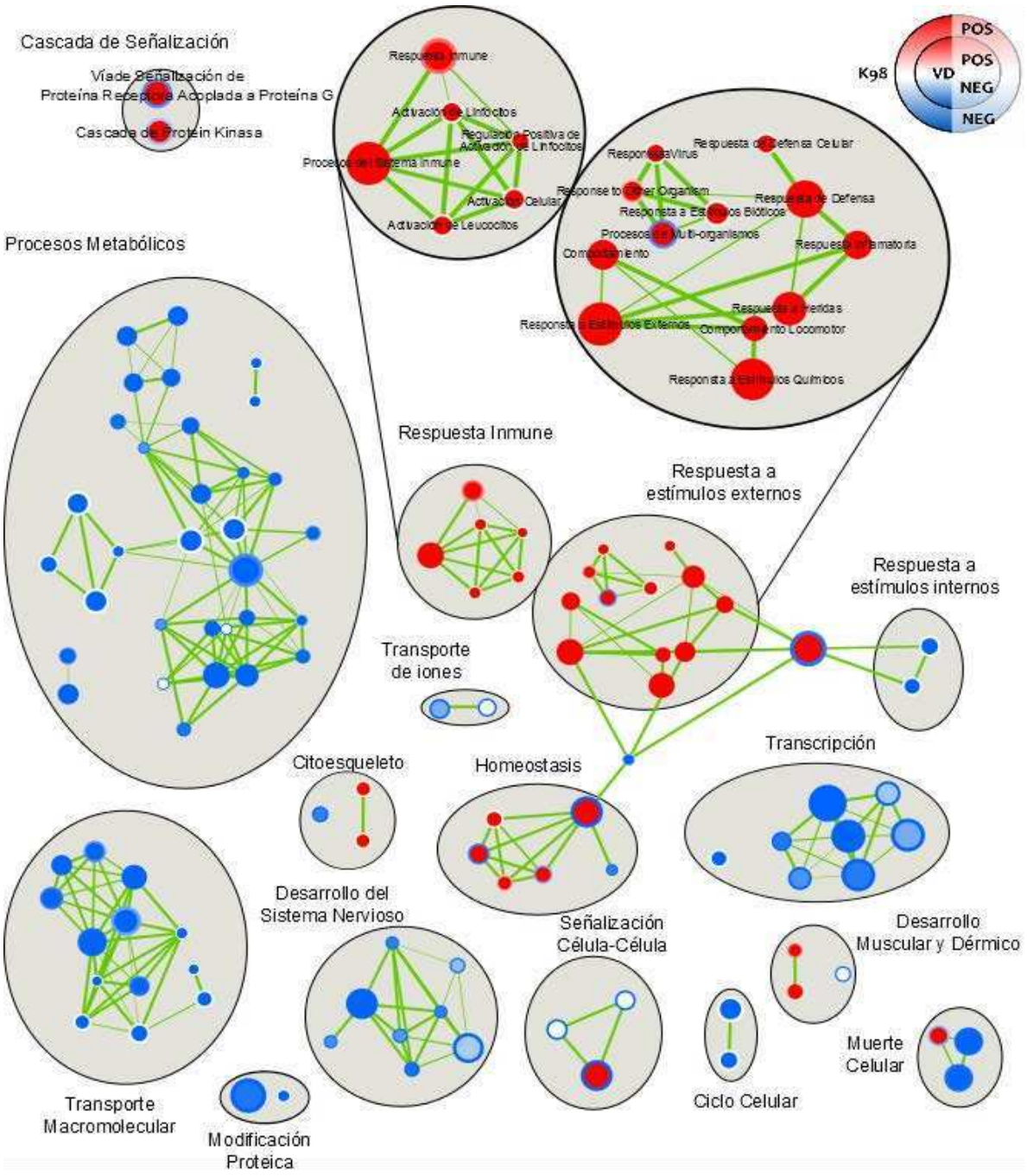


Figura R6. Mapa de Enriquecimiento de expresión génica producto de la respuesta del microambiente placentario a la infección con *T. cruzi*.

El mapa de enriquecimiento organiza los distintos conjuntos enriquecidos de genes como una vía similar, donde los nodos corresponden a vías y las líneas que unen los nodos corresponden a superposición de los genes miembros. La red fue re-arreglada de forma manual para mejorar la disposición, y los grupos mayores se nombraron manualmente. Las vías predichas están representadas por los nodos (círculos), donde un rango

de rojo corresponde a conjuntos génicos con regulación positiva y rango de azul a conjunto de genes con regulación negativa, con respecto al control. El color de relleno de cada círculo corresponde al grupo VD, mientras que el color del borde corresponde al grupo K98.

1.5. Validación del Microarreglo

1.5.1. Validación a nivel de ARNm por RT-qPCR. Los hallazgos observados a partir del experimento de transcriptómica fueron validados empleando la técnica de RT-qPCR para medir los niveles de expresión de un subconjunto de genes elegidos (Figura R7 y Tabla R2). Se seleccionaron 22 genes que presentaron grandes cambios relativos con respecto al control sin infectar ($-2 > FC < 2$) y p-valores < 0,05.

Además de las muestras biológicas usadas en el microarreglo, se incluyó una muestra de placenta independiente adicional por cada uno de los animales de experimentación, sumando un total de tamaño muestral a n = 8 para cada uno de los grupos (infectados con VD, K98 y control no infectado). De cada una de estas muestras se obtuvo ADN copia a partir de ARN total, que sirvió como molde para la amplificación de los 22 genes blancos seleccionados, medida en tiempo real utilizando *Sybr Green* y relativizada a la amplificación del gen endógeno de control interno *Gapdh.* Los resultados de validación se muestran en la Tabla R2 y en la Figura R7.

Consistentemente con los datos obtenidos en el microarreglo, los genes con mayores niveles de expresión en el grupo VD con respecto al grupo control pero no en K98 fueron los siguientes (Figura R7 y Tabla R2): *Cd3d*, *Cd8b1*, *Gbp2*, *Gbp3*, *Gbp6*, *H2-Aa*, *H2-Eb1*, *Igtp*, *Irgb10*, *Irgm1*. La comparación de los niveles de expresión de los genes *Cd8b1*, *Gbp3*, *Gbp6*, *H2-Aa*, *Irgb10*, *Irgm1* por RT-qPCR entre los tres grupos mediante ANOVA mostró que también existen diferencias significativas entre los grupos K98 y control, en todos los casos con mayores niveles de expresión en el primero (Tabla R2). Estas diferencias, sin embargo, no fueron detectadas en el microarreglo.

Gen	C	K98	VD	ANOVA	K98/C	VD/C	Mann-Whitney	Valida
Ccl3	1,341	9,088	6,922	0,0032	6,376	4,857	0,2802	SI
Ccl4	0,533	3,105	11,963	0,0014	4,219	16,258	0,2472	SI
Ccl7	1,645	7,217	17,069	0,0070	2,885	6,823	0,1877	SI
Cd274	8,508	19,324	48,304	0,0015	1,981	4,953	0,0648	SI
Cd3d	0,735	5,013	69,593	< 0,0001	5,341	74,149	≤0,0001	SI
Cd74	3,543	47,711	9,536	0,0249	9,600	1,919	0.4331	NO
Cd8b1	0,167	3,112	29,911	< 0,0001	13,771	132,360	0,0005	SI
Cxcl1	4,257	39,325	5,979	0,0253	7,449	1,133	0,0413	SI
Edn2	3,834	16,118	23,066	0,0111	3,105	4,444	0,4660	SI
Gbp2	2,568	11,645	33,756	< 0,0001	4,517	13,094	0,0009	SI
Gbp3	4,718	8,567	21,050	0,0003	1,781	4,376	0,0249	SI
Gbp6	5,188	11,388	30,625	0,0002	2,017	5,425	0,0052	SI
Gzmg	0,064	0,003	0,014	0,0047	0,050	0,212	0,5041	SI
Hbb-γ	26,531	29,209	231,810	0,0823	0,930	7,382	0,3231	NO
H2-Aa	1,371	4,071	22,352	< 0,0001	2,689	14,766	0,0019	SI
H2-Eb1	1,678	4,677	32,737	< 0,0001	2,520	17,640	0,0039	SI
Igtp	2,045	7,328	20,807	< 0,0001	3,479	9,879	0,0002	SI
Irgb10	0,708	10,219	25,945	0,0002	12,784	32,457	0,0023	SI
Irgm1	0,036	0,137	0,657	< 0,0001	3,555	17,007	0,0005	SI
Ppbp	6,845	8,436	12,886	0,7925	0,545	0,832	0,6294	NO
S100a9	0,043	0,335	0,082	0,0016	6,689	1,639	0,0074	SI
Serpina5	0,027	0,001	0,024	0,1428	0,005	0,095	0,1464	NO

Tabla R2. Resultados de la validación del microarreglo por RT-qPCR.

Valores de las medianas en escala logarítmica relativa para los grupos control (C), infectados con K98 y VD, y valores normalizados con respecto al control (K98/C y VD/C); valores de p para los análisis de ANOVA no paramétrico y Mann- Whitney.

La comparación entre los tres grupos por ANOVA no-paramétrico y posterior contraste múltiple permitió validar una disminución en la transcripción del gen *Gzmd* en ambos grupos de infección con *T. cruzi* con respecto al control, sin encontrarse diferencias significativas por el test no-paramétrico Mann-Whitney relativizando con la mediana del control sin infección (Tabla R2).

De la misma manera, por ANOVA no-paramétrico, se validó el aumento de expresión de los genes *Ccl3*, *Ccl4* y *Edn2*, los cuales no presentaron diferencias significativas de expresión al comparar los dos grupos de infección por el test no-paramétrico Mann-Whitney (Tabla R2).

Los genes *Cxcl1* y *S100a9* estuvieron aumentados en su transcripción con respecto al control sólo en el grupo K98 y no en el grupo VD, y estos resultados también se observaron al comparar los tres grupos por ANOVA no-paramétrico (Tabla R2), siendo que sólo el grupo K98 tenía una expresión aumentada al realizar el test de múltiples comparaciones de Sidak y corroborando así nuevamente los resultados del análisis transcriptómico.

Por último, no se observaron diferencias significativas por RT-qPCR en la comparación por Mann-Whitney entre las medianas de los valores de transcripción relativos al control, de los genes *Ccl7* y *Cd274*. Sin embargo, al comparar los tres grupos en el ANOVA no-paramétrico estos genes revelaron mayores niveles de expresión en el grupo VD comparando con el control, pero niveles comparables de expresión entre el grupo K98 y el control (Tabla R2), validando así los resultados de transcriptómica.

De los 22 genes seleccionados para validación, cuatro no pudieron reflejar los resultados del microarreglo bajo ninguna de las comparaciones analizadas (Tabla R2). En el caso del gen *Cd74* que en los resultados de transcriptómica se encontró regulado positivamente en el grupo VD y no en K98 con respecto al control, por RT-qPCR se observó una mayor transcripción en el grupos K98 con respecto a los otros grupos en el análisis de ANOVA no paramétrico, pero no hubo diferencias entre los grupos infectados cuando se relativizaron los valores a los presentados en ausencia de infección. En cambio, *Ppbp* y *Hbb-γ* aumentados en el grupo K98 pero no en VD en los resultados transcriptómicos, no presentaron diferencias significativas entre los tres grupos por RT-qPCR. Finalmente, *Serpina5*, un gen que mostró una menor transcripción en ambos grupos en el abordaje trascriptómico, no mostró diferencias significativas bajo ningún análisis.

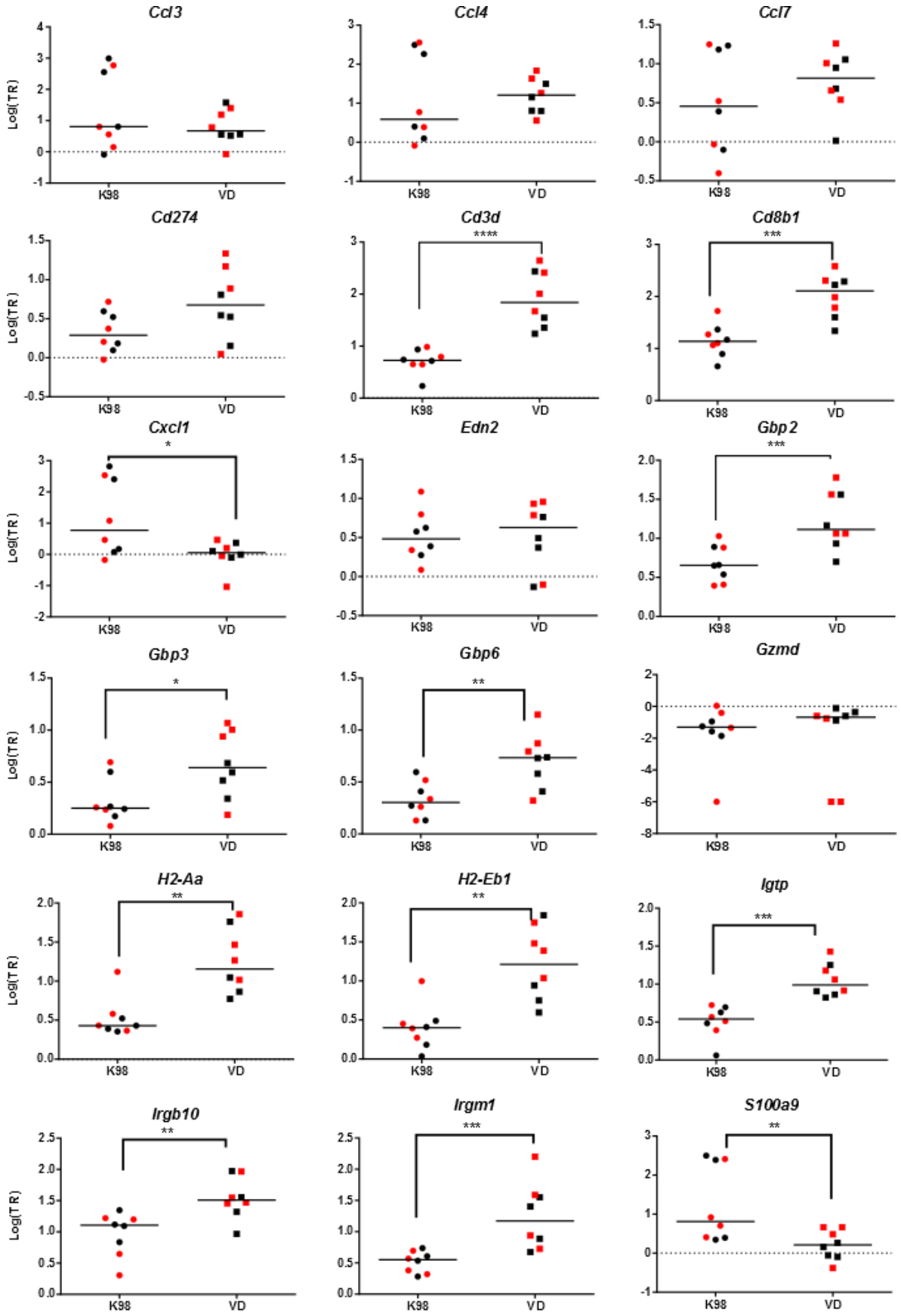

Ccl3
Ccl4
Ccl7
Cd274
Cd3d
Cd8b1
Cxcl1
Edn2
Gbp2
Gbp3
Gbp6
Gzmd
H2-Aa
H2-Eb1
Igtp
Irgb10
Irgm1
S100a9
Log(TR)
K98
VD
*
**
***
****

Figura R7. Validación por RT-qPCR de los resultados obtenidos del microarreglo.

Valores en escala logarítmica de la transcripción relativa (TR) con respecto al grupo control sin infección de los grupos K98 y VD por RT-qPCR de los genes seleccionados y que validaron los datos transcriptómicos. Los puntos rojos indican muestras utilizadas en el microarreglo y los puntos negros muestras independientes.

* p <0,05

** p <0,01

*** p <0,001

1.5.2. Validación del Microarreglo por Western Blot. Con el fin de validar por otra metodología los resultados del microarreglo se decidió determinar los niveles de expresión proteica de CXCL1 y CD274 por Western blot (Figura R8). Acorde con los resultados obtenidos a partir de los experimentos de microarreglo y de RT-qPCR a nivel de ARN mensajero, se observó un mayor nivel de expresión para CXCL1 (Figura R8A) en el grupo K98 comparado con VD ($p < 0,01$) y con el grupo control ($p < 0,05$). Más aún, los niveles de expresión para esta proteína en los animales infectados con VD fueron menores que en el grupo control, aunque estas diferencias no resultaron significativas.

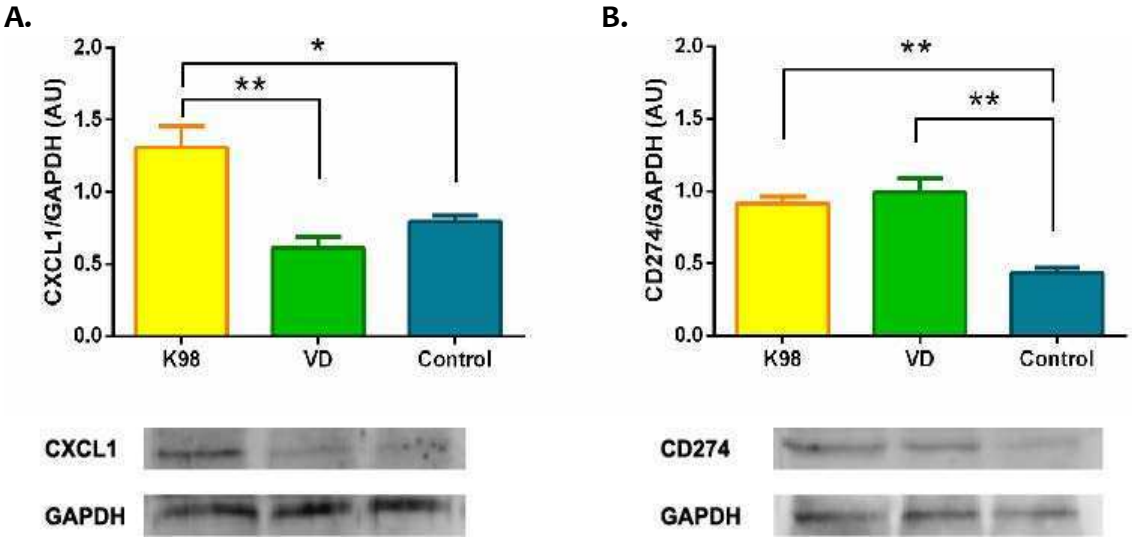


Figura R8. Validación por Western blot de los resultados obtenidos del microarreglo. Análisis de las proteínas CXCL1 (A) y CD274 (B) en muestras de placentas de los grupos K98, VD y control. La inmunorreactividad de las bandas fue cuantificada por densitometría. Los resultados se expresaron como unidades arbitrarias (AU), relativas a GAPDH. El análisis estadístico se llevó a cabo con el test Kruskal-Wallis con múltiples comparaciones.*p < 0.05

** p < 0.01

Por otro lado, el ensayo de microarreglo fue capaz de detectar diferencias en VD pero no así en K98 en cuanto a la expresión de ARN mensajero del gen *Cd274*. Sin embargo, por Western blot y RT-qPCR, el tejido placentario de ambos grupos de ratones infectados mostró valores comparables de expresión de esta proteína y mayores a los observados para el control ($p < 0,01$) (Figura R8B). Estos resultados confirman que el aumento en la expresión del ARN mensajero de *Cd274* hallado durante la infección por *T. cruzi* está asociado a su vez a un mayor nivel de la proteína correspondiente.

2. Análisis histopatológicos

Con la finalidad de estudiar las características histopatológicas de cada grupo, las placentas se procesaron mediante técnicas histológicas rutinarias y se tiñeron con hematoxilina-eosina.

El grupo control (Figura R9A y D) mostró una estructura histológica normal del espongiotrofoblasto y del laberinto y la barrera placentaria tricorial fue evidente en la porción placentaria laberíntica. Así mismo se observó el trofoblasto gigante formando la superficie de las vellosidades fetales. Los glóbulos rojos se observaron principalmente en los capilares fetales mientras que las vesículas maternas se encontraron practicamente vacías. También se observaron algunos depósitos de fibrinoides. En cuanto a las placentas provenientes de animales infectados, aquellas infectadas con la cepa K98 (Figura R9B y E) mostraron áreas con edema (Figura R9B) y un aumento de los depósitos de fibrinoides (Figura R9E), sin embargo la barrera placentaria resultó intacta. Por el contrario, las placentas infectadas con la cepa VD (Figura R9C y F) mostraron destrucción y desprendimiento del espongiotrofoblasto, aumento de la deposición fibrinoide, infiltrado inflamatorio y una destrucción tisular severa compatible con áreas necróticas (Figura R9C).

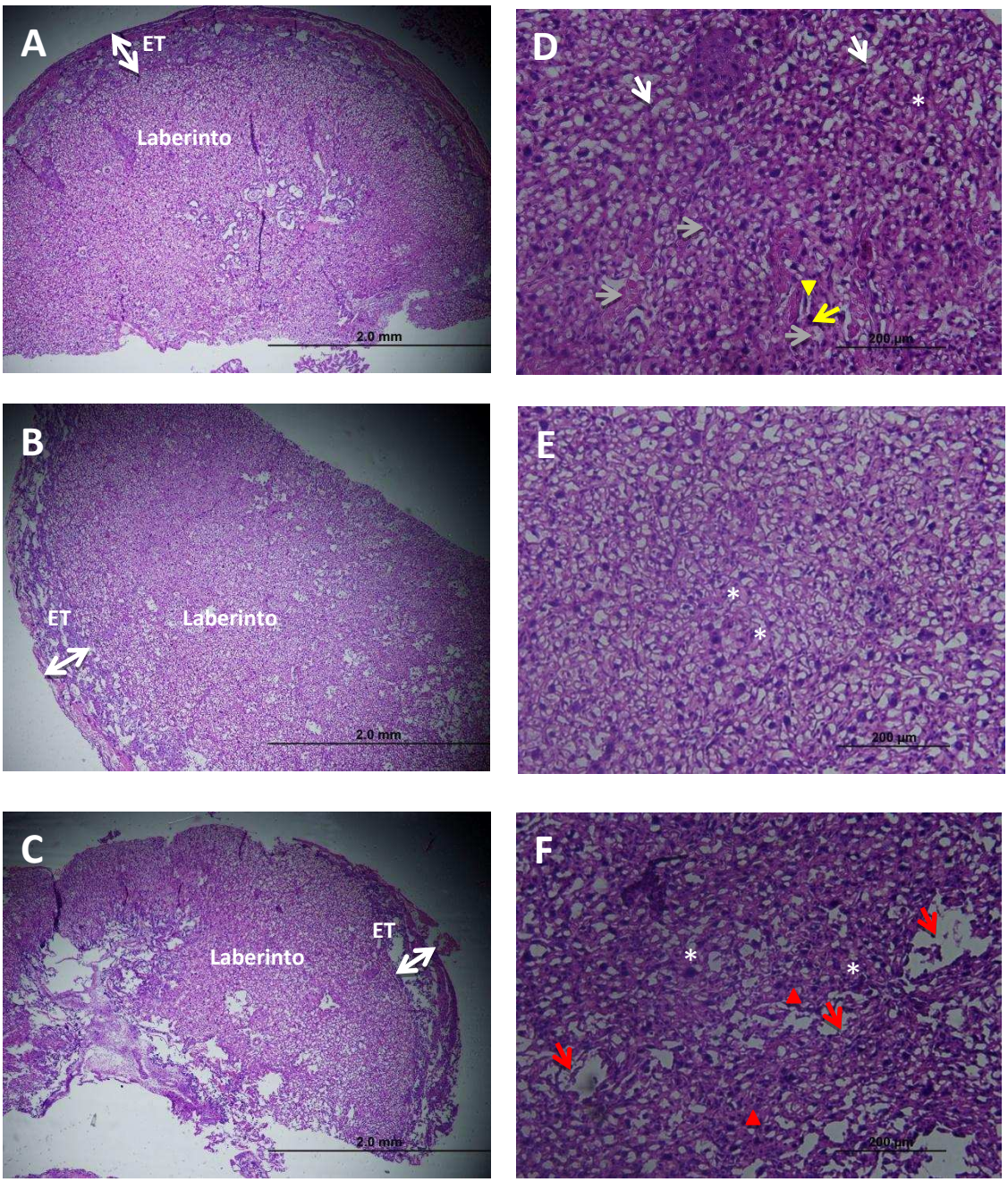


Figura R9. Análisis histopatológico de placentas control (A y D), infectadas con K98 (B y E) y con VD (C y F). ET: Espongiotrofoblasto; barrera placentaria tricorial (flechas blancas); vellosidades fetales (flechas amarillas); capilares fetales (flechas grises); vesículas maternas (punta de flecha amarilla); depósitos de fibrinoides (asterisco blanco); infiltrado inflamatorio (puntas rojas) y destrucción tisular severa (flechas rojas). La barra negra representa2 milímetros (A, B, C) o 200 micrómetros (D, E y F).

3. Estudios parasitológicos

A partir de la información obtenida del microarreglo, donde hemos encontrado una clara respuesta diferencial a nivel de expresión génica entre placentas de animales infectados con las cepas VD y K98 de *T. cruzi*, se decidió estudiar si dichas diferencias eran efecto de la carga parasitaria. Con este objetivo, se evaluó la carga en muestras de sangre materna así como también en las placentas analizadas tanto en el microarreglo como en la posterior validación (n = 8, para cada grupo).

3.1. Cuantificación relativa de ADN satélite de *T. cruzi* en el binomio materno-fetal y en tejido placentario

La determinación de carga parasitaria en la sangre materna en los animales se hizo mediante qPCR con sondas TaqMan de ADN satélite de *T.cruzi* cuantificando con una curva patrón con número conocido de parásitos (cuantificación absoluta). Sin embargo, debido al uso de muestras de origen variable (sangre y tejidos), se decidió normalizar los valores con el gen endógeno *β-Actina* de ratón. Para tal fin, se construyó una curva con diluciones seriadas al décimo (partiendo de la muestra sin diluir hasta una dilución 10^{-5}) de este gen otorgándole valores arbitrarios y adecuados a cada factor de dilución, y estos valores se utilizaron para relativizar la cuantificación de ADN parasitario.

La cuantificación mostró mayores niveles de ADN de *T. cruzi* en las hembras infectadas con la cepa K98 comparando con la cepa VD ($p = 0,029$) con medianas en forma logarítmica de 1,965 y 1,058, respectivamente (Figura R10A). Sin embargo, esta relación se invirtió en el tejido placentario, es decir, se detectó una mayor cantidad de ADN de *T. cruzi* en placentas de animales infectados con VD (Log (Mediana) = 3,134), siendo aproximadamente 40 veces mayor que en K98 (Log (Mediana) = 1,554) ($p = 0,0002$) (Figura R10B). Cabe destacar, que en la infección con K98 los niveles de parásitos en sangre materna comparados con los detectados en placenta, disminuyeron aproximadamente unas 3 veces, mientras que en la infección con VD aumentaron 120 veces.

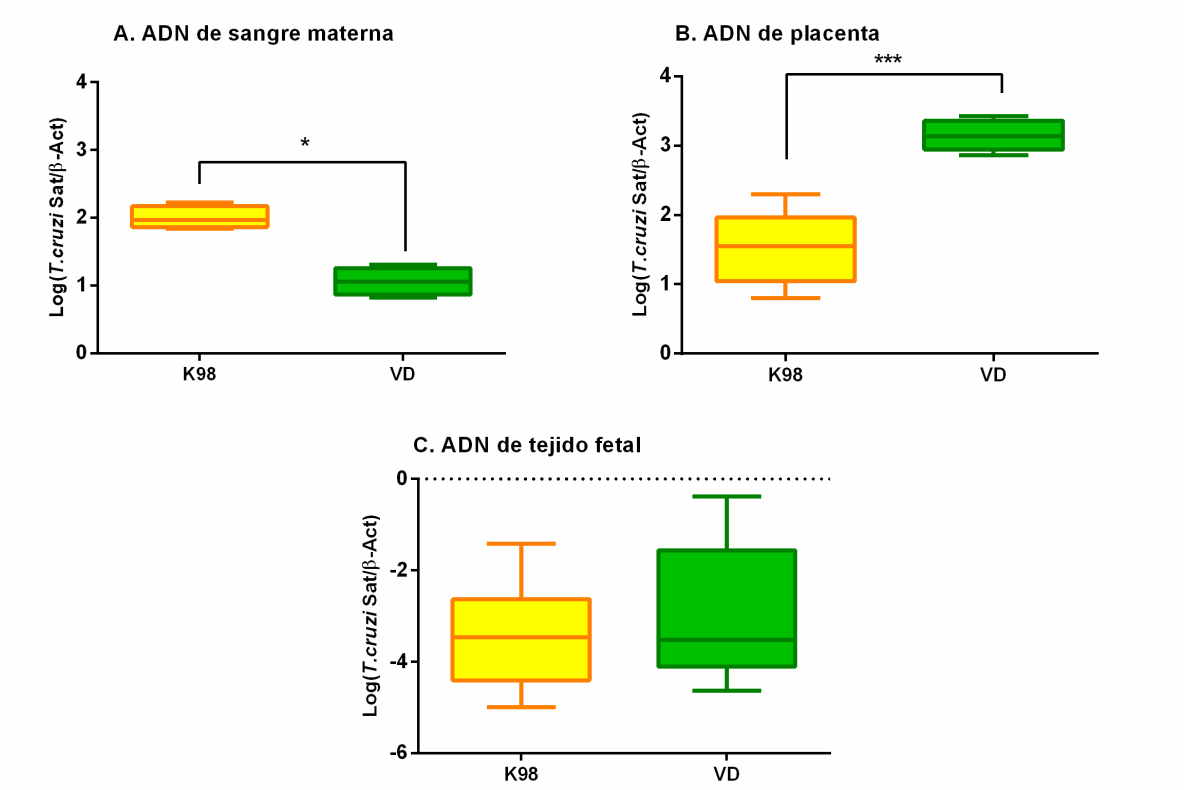


Figura R10. Determinación de carga parasitaria en ratones C57Bl/6J.

La presencia de *T. cruzi* correspondiente tanto a la cepa K98 como VD se determinó por amplificación de ADN satélite de *T. cruzi* normalizado con ADN *β-Actina* murina en sangre materna (A), placenta (B) y tejido fetal (C). Los gráficos muestran cada una de las relaciones en escala logarítmica.

* p <0,05

** p <0,001

Ninguna de las tendencias descriptas anteriormente se observaron en la determinación en tejido fetal, ya que en este tejido no hubo diferencias significativas entre los dos grupos de infección (p = 0,777) (Figura R10C). Además, no hubo diferencias significativas entre las muestras de sangre materna, placenta y tejido fetal en el grupo K98, mientras que en el caso de VD, los niveles de ADN de *T.cruzi* en las madres y en los fetos con respecto a la placenta fueron significativamente menores (p < 0,0001). Al comparar las muestras de sangre materna, placenta y tejido fetal sin discriminar entre grupos de infección, se observó que los niveles de carga parasitaria en los fetos resultaron menores que en las muestras de sangre materna y placenta (p < 0,0001). La positividad del 100% de los fetos para ADN satélite de *T. cruzi* y los bajos niveles de carga parasitaria en los mismos

comparando con el resto de las muestras analizadas, sugieren que esta observación puede haberse debido a contaminación de las muestras fetales con ADN materno y no de la existencia de una infección fetal verdadera.

Los resultados obtenidos anteriormente indicarían la existencia de tropismo placentario en la cepa VD, la cual proviene de un caso congénito, y no en la cepa K98.

3.2. Análisis de la viabilidad de *T.cruzi* en placenta

Se decidió proceder a determinar si los parásitos permanecían viables en las placentas que luego serían utilizadas en los análisis de expresión génica. Para ello, se diseñó una reacción de RT-qPCR utilizando como blanco el gen que codifica para el ARN ribosomal (ARNr) 18S, que presenta alta conservación de secuencia y expresión constitutiva, para poder ser utilizado para el análisis de cualquier cepa parasitaria.

3.2.1. Diseño de oligonucleótidos. Se realizó la búsqueda de secuencias completas de ARNr 18S derivadas de cepas de referencia, utilizando la base de datos GenBank en el sitio http://www.ncbi.nlm.nih.gov. Se construyó un alineamiento de 2263 pb, que incluyó un total de 76 secuencias (15 TcI, 18 TcII, 36 TcIII, 2 TcIV, 4 TcV y 1 TcVI), y reveló un alto grado de conservación nucleotídica (95,7%), aunque con una región central, entre los sitios 1006 y 1132, altamente polimórfica entre las distintas UDTs. Sin embargo, se centró la búsqueda en regiones conservadas de forma tal de independizarse del genotipo del parásito**.** A partir de la información obtenida se diseñaron oligonucleótidos "sentido" y "anti-sentido" en posiciones altamente conservadas (Figura R11).

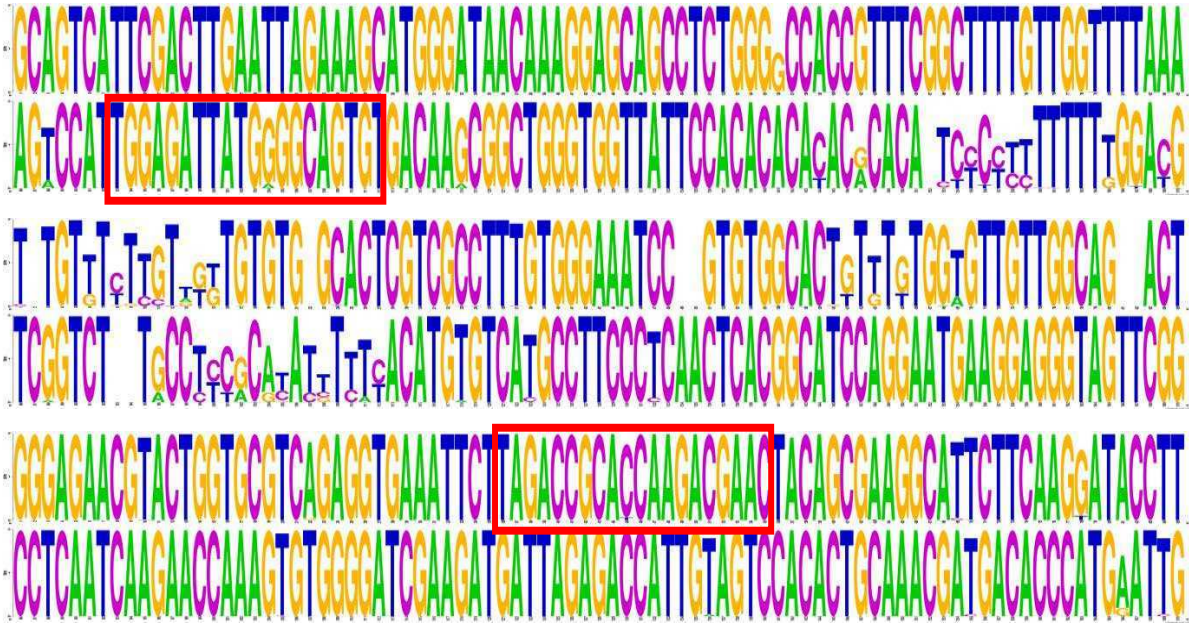


Figura R11. Logo de secuencias correspondientes al gen que codifica para el ARNr 18S, representando el nivel de conservación nucleotídica de cada posición.

Los rectángulos rojos indican las regiones para las cuales se generaron los cebadores utilizados en la qPCR.

3.2.2. Optimización de las condiciones de ciclado. Inicialmente, se realizó una primera prueba de la reacción utilizando ADN copia obtenido a partir de ARN total de muestras de placentas del grupo control (sin infección) contaminadas con 2 x 10^5 parásitos, tanto de la cepa VD (TcVI) como de la cepa K98 (TcI). Como templado se utilizó la muestra sin diluir, 5 diluciones seriadas al décimo de ésta y un control negativo de amplificación (NTC). Se evaluaron dos temperaturas de hibridación, 60°C correspondiente a la temperatura utilizada para el gen de control interno *Gapdh y* 64°C que corresponde a la temperatura de disociación de ambos oligonucleótidos.

Al comparar los resultados obtenidos, se observó que la mayor temperatura era más adecuada para la amplificación de la secuencia blanco, debido a una menor formación de dímeros de oligonucleótidos (Figura R12) en las diluciones más altas, donde los dímeros compiten con la secuencia específica.

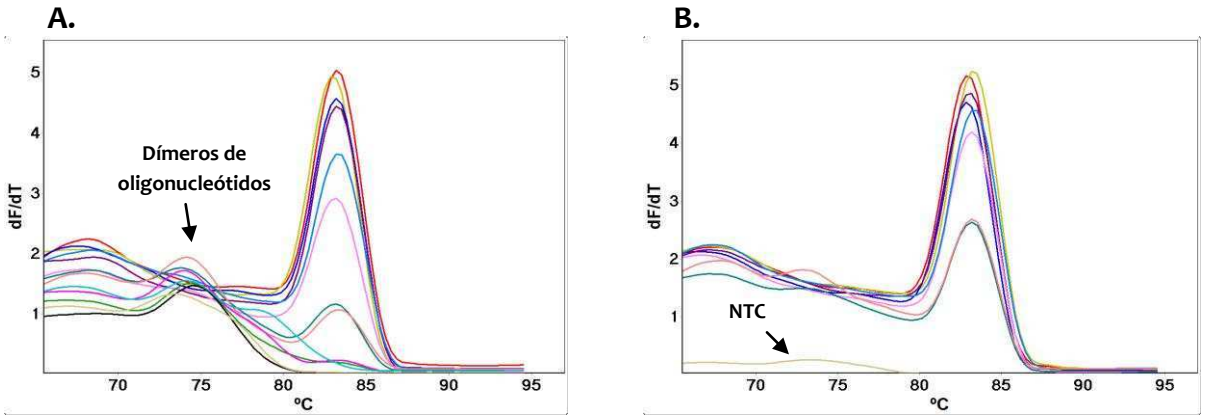


Figura R12. Curvas de disociación de la RT-qPCR cuya secuencia blanco es ARNr 18S de *T.cruzi*.

Los gráficos muestran el cociente de la diferencia de fluorescencia y de tiempo (dF/dT) en función de la temperatura (°C) utilizando 60°C (A) y 64°C (B), como temperaturas de hibridación durante la aplicación. NTC: control sin templado.

3.2.3. Elaboración de curvas de cuantificación. Una vez seleccionada la temperatura de hibridación más adecuada para la amplificación de la secuencia ARNr 18S de *T. cruzi,* se evaluaron curvas de cuantificación a partir del ADN copia en su concentración original y 5 diluciones seriadas al décimo, para las cepas VD y K98 por separado. Como se puede observar en la Figura R13, en el caso de VD el rango en el cual se mantiene la linealidad de la curva fue desde la muestra sin diluir (2 x 10^5 parásitos) hasta la última dilución de estudio (2 parásitos). En cambio, la última dilución en la curva de K98 (2 parásitos) no mantenía la linealidad y por lo tanto fue descartado dicho punto.

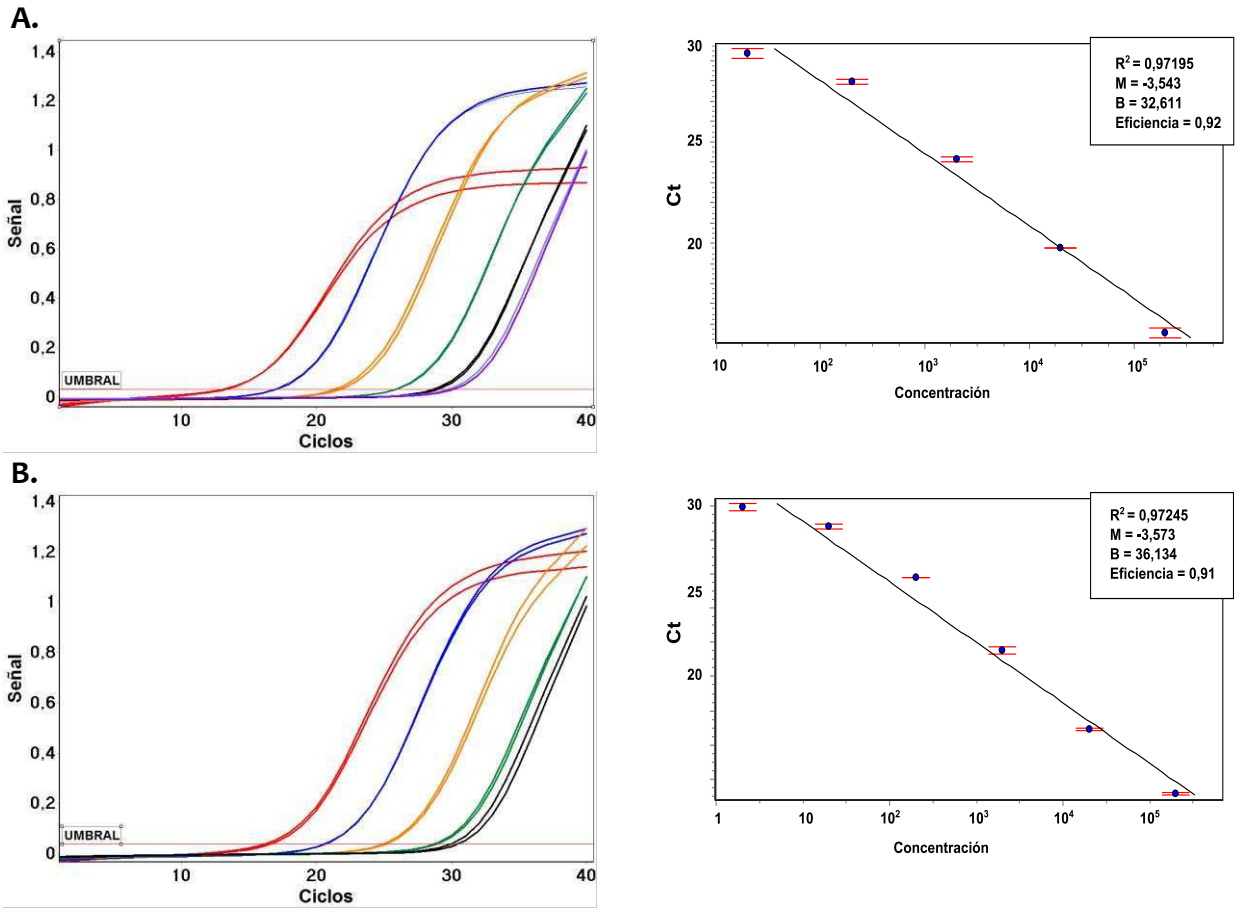


Figura R13. Curvas de cuantificación por RT-qPCR de ARNr 18S de K98 (A) y VD (B).

En los paneles de la izquierda se muestran los gráficos de amplificación y en los paneles de la derecha se grafica la regresión lineal correspondiente a las curvas estándar de reacción que muestran la relación entre el ciclo umbral (Ct) y la cantidad de ADN genómico (log10). Inserto: indica la estadística de la regresión lineal.

3.2.4. Cuantificación relativa de ARNr 18S de *T.cruzi* en placenta de ratón. En todas las placentas que fueron luego utilizadas en los análisis de expresión diferencial, tanto para el microarreglo como para la validación independiente del mismo, se realizó la RT-qPCR diseñada para cuantificación del ARNr 18S, de manera de evaluar la viabilidad de los parásitos presentes en este tejido.

A pesar de que la cuantificación a partir de las curvas descriptas en la sección Resultados R1 3.2.3 es absoluta, al tratarse de tejido extraído con el método manual de Trizol, en el cual la recuperación de ARN es muy variable, se decidió normalizar los valores

obtenidos para ARNr 18S por los valores del gen de expresión endógena y constitutiva en ratón *Gapdh.* Para esta normalización, también se construyó una curva de cuantificación para el gen control (desde la muestra sin diluir hasta a una dilución 10^{-5}), asignando un valor arbitrario a cada punto que contemple el factor de dilución empleado.

Los resultados obtenidos (Figura R14) fueron similares a los observados para el ADN parasitario (Figura R10B), con expresión en escala logarítmica en VD aproximadamente 40 veces mayor (Log (Mediana) = 1,941) que en K98 (Log (Mediana) = 0,275) (p = 0,002). En su conjunto, estos resultados indicarían que no sólo hay mayor carga de parásitos en las placentas infectadas con VD, sino que el ADN detectado corresponde a parásitos viables.

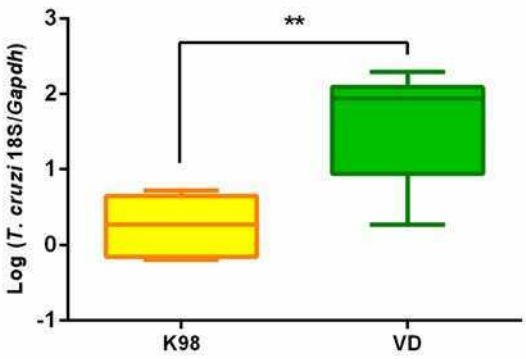


Figura R14. Determinación de parásitos viables por amplificación de ARNr 18S normalizado con *Gapdh* murino.

Los gráficos muestran cada una de las relaciones en escala logarítmica.

** p <0,001

3.3. Caracterización de poblaciones parasitarias

3.3.1. PCR-RFLP. La caracterización directa de las poblaciones parasitarias obtenidas a partir de muestras sanguíneas de las hembras y del tejido placentario, se realizó mediante estudios de polimorfismo de fragmentos de restricción (RFLP, del inglés *restriction fragment lenght polymorphism*). Se evaluaron el total de madres y de placentas utilizadas en el estudio (microarreglo y validación, n = 8 para cada grupo). Esta técnica se aplicó a productos de amplificación de la región variable del ADN de minicírculo del parásito de 330pb (RFLP-PCR),

generando un perfil de digestión que fue analizado mediante electroforesis en geles de poliacrilamida. Con el objetivo de obtener el mayor polimorfismo posible, de cada extracción se amplificó la secuencia variable del minicírculo mediante PCR y se procedió a la digestión con las siguientes enzimas de restricción: Rsa I, Hinf I y Msp I.

Los resultados de este estudio mostraron que las poblaciones parasitarias presentan un perfil de digestión propio para cada cepa, K98 y VD, con una distancia de Jaccard de 0,875. Además, se pudo observar que la variabilidad intra-cepa fue nula entre las distintas hembras y entre éstas y las correspondientes placentas y fetos (DJ = 0), sugiriendo monoclonalidad. Como ejemplo, la Figura R15 muestra el perfil de la población parasitaria detectada en sangre de una hembra infectada con la cepa K98 y otra con VD con dos de sus placentas.

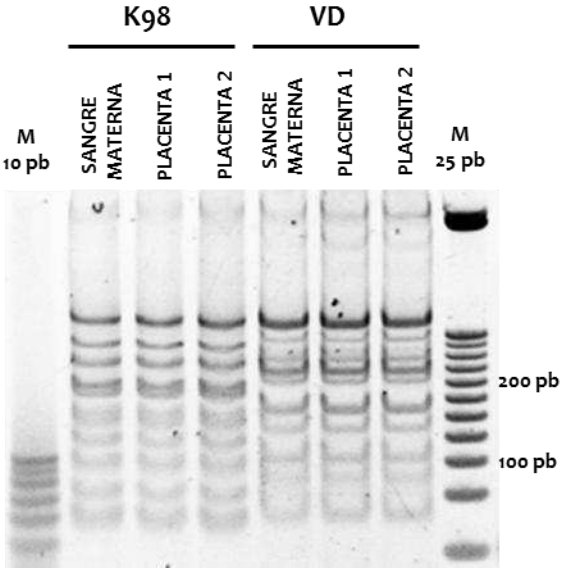


Figura R15. Poblaciones parasitarias en madres y placentas de ratones infectados con las cepas VD y K98.
Electroforesis en gel de poliacrilamida de productos de PCR-RFLP realizados por digestión triple de amplicones de ADN del minicírculo del parásito. M: marcador de peso molecular de ADN.

3.3.2. Microsatélites. Para caracterizar el grado de clonalidad, especialmente de la cepa VD derivada de un caso congénito, se realizó un análisis de 5 *loci* polimórficos correspondientes a repeticiones de microsatélites: TcTAC15, TcATT14, TcGAG10, TcCAA10 y TcTAT20. Debido a las cargas parasitarias observadas, para llevar a cabo dicho ensayo fue necesario realizar previo a la electroforesis capilar una PCR anidada de forma tal de aumentar la señal.

Cepa de *T. cruzi*	Binomio	Muestra	*Locus* (pb)			
			TcTAC15	TcATT14	TcGAG10	TcCAA10
K98						
	1	Maternal Blood	96/96	253/253	144/144	125/125
		Placenta	96/96	253/253	144/144	125/125
	2	Maternal Blood	96/96	253/253	144/144	125/125
		Placenta A	96/96	253/253	144/144	125/125
		Placenta B	96/96	253/253	144/144	125/125
	3	Maternal Blood	96/96	253/253	144/144	125/125
		Placenta	96/96	253/253	144/144	125/125
VD						
	1	Maternal Blood	126/129	265/265	138/144	131/155
		Placenta	126/129	265/271	138/144	131/155
	2	Maternal Blood	126/129	265/265	138/138	131/155
		Placenta A	126/129	265/271	138/144	131/155
		Placenta B	126/129	265/271	138/144	131/155
	3	Maternal Blood	126/129	265/265	138/138	131/131
		Placenta	126/129	265/271	138/144	131/155

Tabla R3. Ejemplos de microsatélites de *loci* polimórficos para identificación de poblaciones de *T. cruzi* de muestras maternas y placentarias en ratones infectados con los genotipos K98 y VD.

En la Tabla R3 se muestran ejemplos de binomios (madre-placenta) de ambos grupos de infección para aquellos *loci* que resultaron polimórficos entre cepas, siendo el *locus* TcTAT20 no informativo. *T. cruzi* es un organismo diploide, por lo que presenta dos copias para cada uno de sus genes, pudiendo presentar ambos alelos iguales o diferentes. La cepa K98 resultó ser homocigota para los cuatro *loci* que figuran en la Tabla R3, mientras que VD presentó dos alelos diferentes para estos cuatro *loci* y a su vez distintos a K98, con excepción del alelo 144 en TcGAG10. La detección de muestras homocigotas maternas en la cepa VD pero heterocigotas en las placentas puede deberse a una limitación en cuanto a la sensibilidad del método, ya que por qPCR se había detectado mayor carga parasitaria para VD en placenta que en sangre periférica materna y a una concentración de ADN blanco cercana al límite de detección del método un alelo puede verse favorecido en su amplificación respecto al otro. Además, es de esperar que si la muestra placentaria portase algún clon parasitario no detectable en sangre materna, este debería haber sido detectado además en el análisis por RFLP-PCR de minicírculo. Estos resultados en su conjunto indicarían que las cepas parasitarias del estudio son monoclonales (Tabla R3).

R2

Genes candidatos para marcadores genéticos de infección congénita de *T. cruzi*

La existencia de agrupamiento familiar que presenta la infección congénita y las diferencias en las tasas de transmisión observadas en las distintas poblaciones latinoamericanas hacen pensar la presencia de factores de riesgo relacionados a la genética humana.

En el presente estudio, se han analizado diferentes polimorfismos en genes de expresión placentaria y su asociación con la infección congénita de *T. cruzi.* Con tal fin, se genotipificaron 217 muestras de ADN de niños nacidos de madres con serología positiva para Chagas provenientes de áreas de alta endemicidad de Argentina, de Bolivia y de Paraguay. Estas muestras fueron clasificadas en dos grupos: niños con infección congénita (IC, n = 101) y sin infección congénita (NIC, n = 116).

1. Selección de genes y polimorfismos

Luego de la búsqueda bibliográfica en la base de datos de PubMed/MEDLINE del NCBI se hallaron 72 trabajos que cumplían con los criterios de búsqueda. De ellos, tres genes fueron seleccionados para realizar este estudio: *ALPP*, el cual codifica para la enzima fosfatasa alcalina placentaria (PLAP) y los genes que codifican para las metaloproteinasas 2 (MMP2) y 9 (MMP9). Además, se eligió el gen *ADAM12*, el cual ha sido asociado a la infección con *T. cruzi* en muestras de explantes de placenta (datos no publicados del Laboratorio de Mecanismos de Infección Parasitaria de la Facultad de Medicina de la Universidad de Chile, Dra Ulrike Kemmerling, comunicación personal).

De la búsqueda en la base de datos dbSNP del NCBI, se seleccionaron 11 SNPs localizados en los cuatro genes de expresión placentaria arriba mencionados (Tabla R4). Los criterios utilizados para escoger estos polimorfismos, prestando mayor atención a aquellos ubicados en la región promotora, fueron los siguientes:

- Frecuencia alélica del alelo minoritario (MAF, por sus siglas en inglés Minor Allele Frequence) ≥ 0,10, validada por 1000 Genomas (disponible en el sitio http://www.1000genomes.org/).

- Evidencia previa de que las variantes en la secuencia tienen un efecto en la transcripción de la proteína, en la actividad enzimática o que hayan sido asociadas a alguna patología.

Gen (ID)	SNP	Cr	Posición cromosomal	Tipo de variante	Alelo Ancestral	MAF	Consecuencia Funcional
ALPP (250)	**rs2014683**	2	232378254	SNV	G	A=0,4768	Variante río arriba (2KB)
	rs1048988	2	232380220	SNV	C	C=0,1406	Variante sin sentido
ADAM12 (8038)	**rs11244787**	10	126046147	SNV	A	G=0,1230	Variante intrónica
	rs1871054	10	126093840	SNV	T	T=0,4704	Variante intrónica
MMP2 (4313)	**rs243866**	16	55477625	SNV	G	A=0,1344	Variante río arriba (2KB)
	rs243865	16	55477894	SNV	C	T=0,1366	Variante río arriba (2KB)
	rs17859821	16	55478141	SNV	G	A=0,1380	Variante río arriba (2KB)
	rs243864	16	55478410	SNV	T	G=0,1386	Variante río arriba (2KB)
	rs2285053	16	55478465	SNV	C	T=0,1512	Variante río arriba (2KB)
MMP9 (4318)	**rs3918242**	20	46007337	SNV	C	T=0,1552	Variante río arriba (2KB)
	rs2234681	20	46008773	STR	-	-	Variante río arriba (2KB)

Tabla R4. Descripción de los SNPs seleccionados.

La primera columna describe los genes seleccionados en el estudio, siendo el número entre paréntesis el que corresponde al identificador (ID). Seguido se encuentran los ID de los SNPs para cada gen; el cromosoma (Cr); el tipo de variante según sea de nucleótido simple (SNV: del inglés *Single Nucleotide Variation*) o repeticiones en tándem (STR: del inglés *short tandem repeat (microsatellite) variation*); el alelo ancestral; el alelo de menor representación y su frecuencia según 1000 Genomas (MAF: del inglés *Minor Allel Frequence*); y por último, la consecuencia funcional de dicha mutación, pudiendo ser una variante sin sentido, una variante en la región promotora (dentro de los 2kb río arriba del gen) o una variante ubicada en una región intrónica.

2. Genotipificación

La genotipificación de cada uno de los sitios descriptos en la Tabla R4 permitió la comparación de las frecuencias alélicas y genotípicas entre los grupos de estudio. La caracterización de estos sitios se realizó mediante dos enfoques: i) análisis de HRM para

aquellos polimorfismos de un único nucléotido y ii) electroforesis capilar para el polimorfismo correspondiente al microsatélite **rs2234681**.

2.1. Diseño de técnicas de amplificación por PCR

Se diseñaron oligonucleótidos específicos para cada secuencia y se pusieron a punto las condiciones de ciclado para la amplificación previa necesaria para ambas técnicas (sección Materiales y Métodos 3.6).

Se realizó una primera prueba utilizando como templado 30 ng de ADN genómico humano, una concentración final de 350 nM de oligonucléotidos y como temperaturas de hibridación se le sumaron 2ºC al oligonucleótido de mayor temperatura de disociación. Sin embargo, la baja eficiencia en las reacciones para algunos de los SNPs **rs2014683, rs1048988, rs243865, rs17859821, rs2285053** y **rs3918242**, debido a la baja complejidad de estas regiones promotoras, llevó a decidir emplear la estrategia de PCR "touchdown". En esta variante, la temperatura de hibridación de los oligonucleótidos comienza siendo elevada y va descendiendo durante los sucesivos ciclos. Esta estrategia permite optimizar la reacción asegurando una amplificación inicial, y por consiguiente mayoritaria, de las secuencias más específicas con relación a los oligonucleótidos utilizados (Tabla M1).

2.2. Análisis de Curvas de Alta Resolución

El análisis de curvas de disociación de alta resolución (HRMA, del inglés *High Resolution Melting Analysis*) es una técnica desarrollada recientemente para el análisis post-PCR de forma rápida y de alto rendimiento de mutaciones genéticas o variantes en las secuencias de ácidos nucleicos. El HRMA permite detectar y categorizar rápidamente mutaciones genéticas como los SNPs, identificar nuevas variantes sin secuenciar (tamizaje genético) o determinar la variación genética en una población antes del secuenciado.

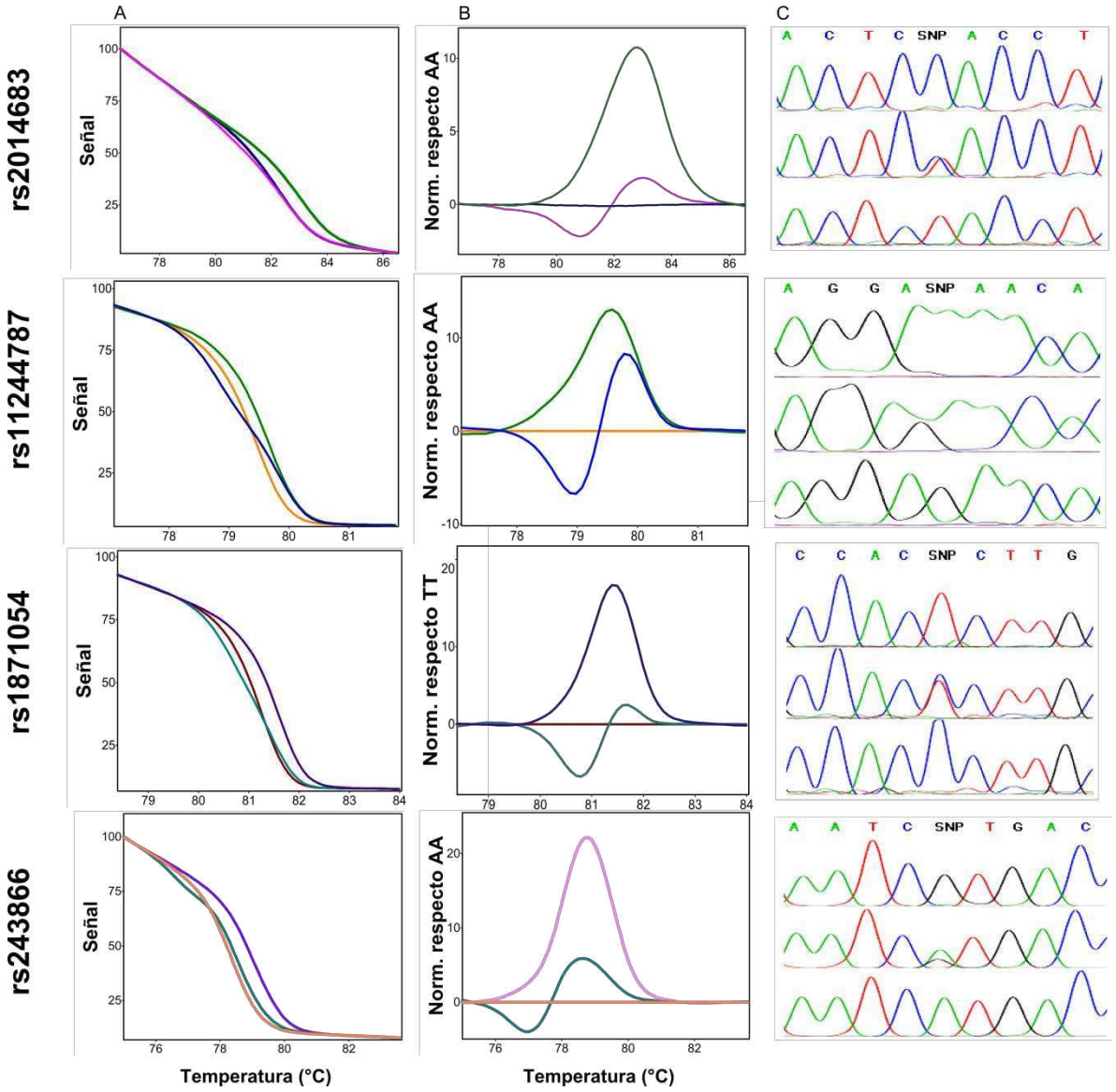
Para conocer el rango de temperaturas en el cual cada producto de reacción se disocia y así establecer el rango de análisis del HRM, se procedió a evaluar las curvas de disociación de los productos de 65ºC a 95ºC con una rampa de 1ºC/seg (Tabla M1) en el equipo Rotor-Gene®, cuyo software permite este tipo de análisis.

Una vez establecida la estrategia de amplificación y el rango de análisis del HRM se continuó con el paneo de las muestras de interés. Se corrió una primera tanda de una selección de 35 muestras al azar y un control sin templado para cada uno de los sitios polimórficos. De esta manera se lograron identificar los tres genotipos posibles para 8 de los 11 *loci:* **rs2014683** (*ALPP*), **rs11244787** y **rs1871054** (*ADAM12*), **rs243866**, **rs243865**, **rs17859821**, **rs243864**, y **rs2285053** (*MMP2*). En cambio, solo se encontró el genotipo homocigota predominante y el heterocigota para **rs3918242** (*MMP9*), y el sitio **rs1048988** de *ALPP* no mostró variabilidad en la población estudiada en la sucesivas corridas, ya que el único alelo hallado fue el ancestral G, y por lo tanto no resultó relevante en el estudio.

En la Figura R16A se grafica el decaimiento de la fluorescencia en función del aumento de la temperatura correspondiente a los 9 SNPs donde se aplicó HRMA. A modo de ejemplo, la fluorescencia correspondiente a la muestra del homocigota GG en el *locus* **rs11244787** decae a mayores temperaturas que en el homocigota AA. Es decir, las dos hebras del ADN producto de amplificación de la PCR específica para dicho *locus* requieren menor energía (temperatura) para disociarse, y de esta forma liberar el colorante que solo fluoresce cuando está unido a ADN, en la muestra GG que en la muestra AA, como resultado de la presencia de tres puentes de hidrógeno en la primera (G-C) y dos en la segunda (A-T). En cambio, en la muestra del heterocigota GA después de la desnaturalización y rehibridización se generan 4 especies: los dos homodúplex (G-C y A-T), y también dos heterodúplex (G-T y A-C). Estas últimas, al no generar un apareamiento del 100 % de sus bases presentan una menor temperatura de disociación. La presencia de las distintas especies produce un cambio en el comportamiento de la curva.

En todos los casos se generaron gráficos para mejorar la visualización y discriminación de los distintos genotipos, donde las curvas de disociación se normalizan respecto al genotipo de menor temperatura de disociación (Figura R16B), siendo su valor constante e igual a cero en función de la temperatura. De esta forma, el genotipo con el homoduplex más estable presenta siempre un pico positivo y el heterocigota presenta dos

picos, el primero negativo (correspondiente a ambos heteroduplex) y el segundo positivo debido a la presencia del homoduplex más estable.



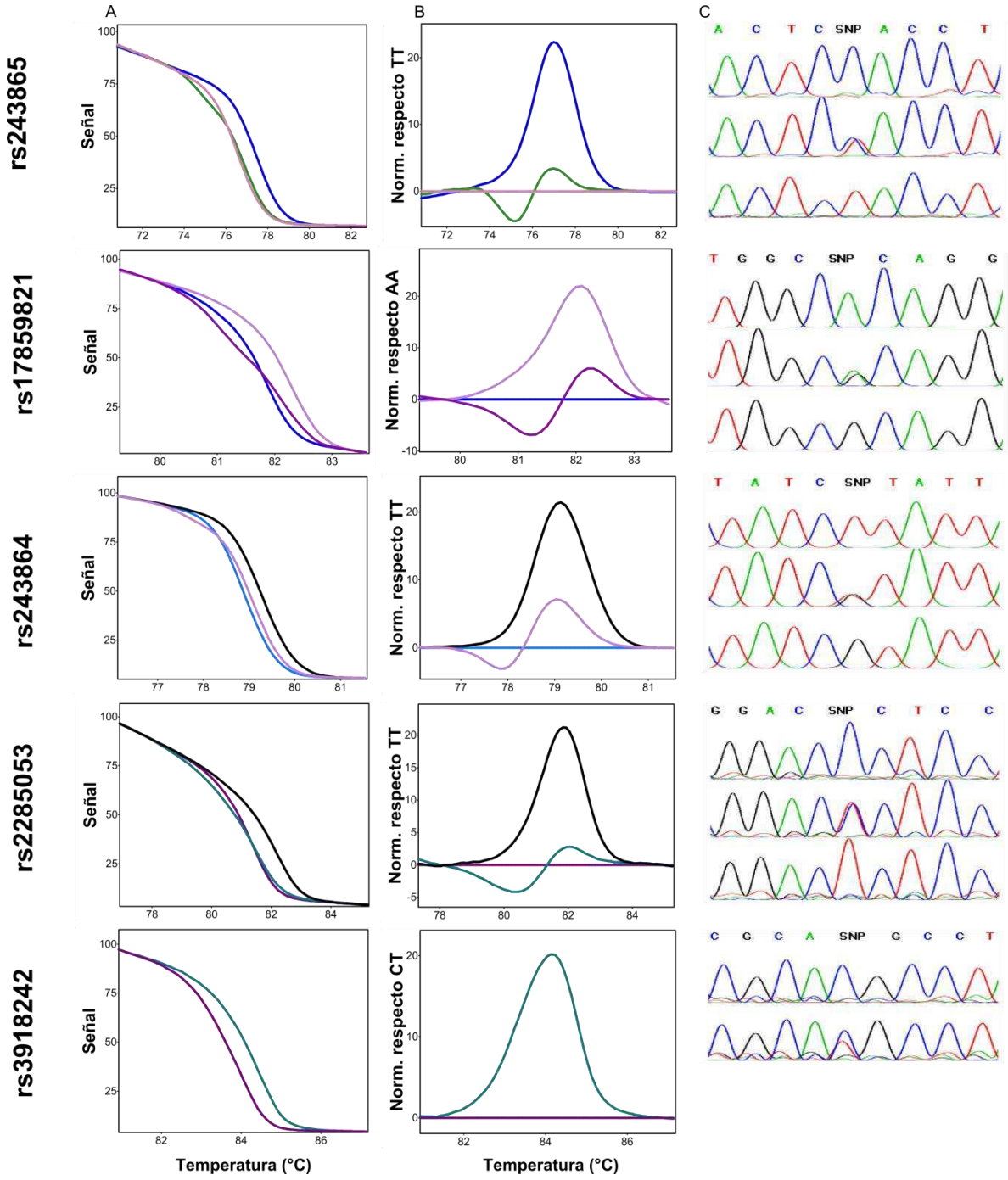


Figura R16. Ejemplos de corridas de genotipificación por HRMA.

El panel A muestra el decaimiento de la fluorescencia en función de la temperatura (°C) de los 9 SNPs polimorficos en la población en estudio y la normalización de la misma con respecto al alelo de menor temperatura de disociación (B). El panel C muestra un ejemplo del electroferograma obtenido por secuenciación de cada genotipo hallado.

Los productos de amplificación de las muestras con perfiles distintivos fueron secuenciados y sirvieron como controles de los genotipos posibles para las subsiguientes corridas. En la Figura R16C se muestra un ejemplo de electroferograma obtenido para cada uno de estos genotipos.

2.3. Electroforesis Capilar

Los intentos de genotipificación del microsatélite **rs2234681** mediante las técnicas de HRM no resultaron exitosos. Este *locus* consiste en repeticiones variables (14-24) de dinucleotidos CA. A pesar de la correcta amplificación del producto de PCR, al tratarse de un sitio multialélico, las curvas de disociación no pudieron diferenciar entre los distintos alelos (Figura R17A). Por esta razón, se probó posteriormente la genotipificación por secuenciación convencional, teniendo en cuenta el corrimiento debido a la heterocigocidad en el análisis. Sin embargo, esta técnica tampoco fue efectiva debido a la dificultad en la lectura de los electroferogramas luego de las repeticiones de CA (Figura R17B), con múltiple superposición de picos para cada posición.

Por lo descripto anteriormente, este *locus* fue analizado mediante el uso de electroforesis capilar con un cebador marcado radiactivamente (Tabla M1), posterior a la amplificación por PCR convencional. Cada muestra sometida a electroforesis capilar puede mostrar uno o dos picos, según corresponda a un individuo homocigota o heterocigota, respectivamente. El punto de corte entre los alelos de bajo número de repeticiones de CA (L) y de alto número de copias (H) se colocó en un tamaño de 160 pb, correspondiente al amplicón para el alelo con 21 repeticiones CA. La Figura R17C muestra ejemplos de muestras de un individuo homocigota LL con un tamaño de producto de PCR de 146 pb, otro portador de dos alelos con alto número de copias (HH), y por lo tanto el pico de fluorescencia se desvía hacia la derecha y, la última imagen de electroforesis muestra un individuo heterocigota (HL), en el cual se visualizan ambos picos.

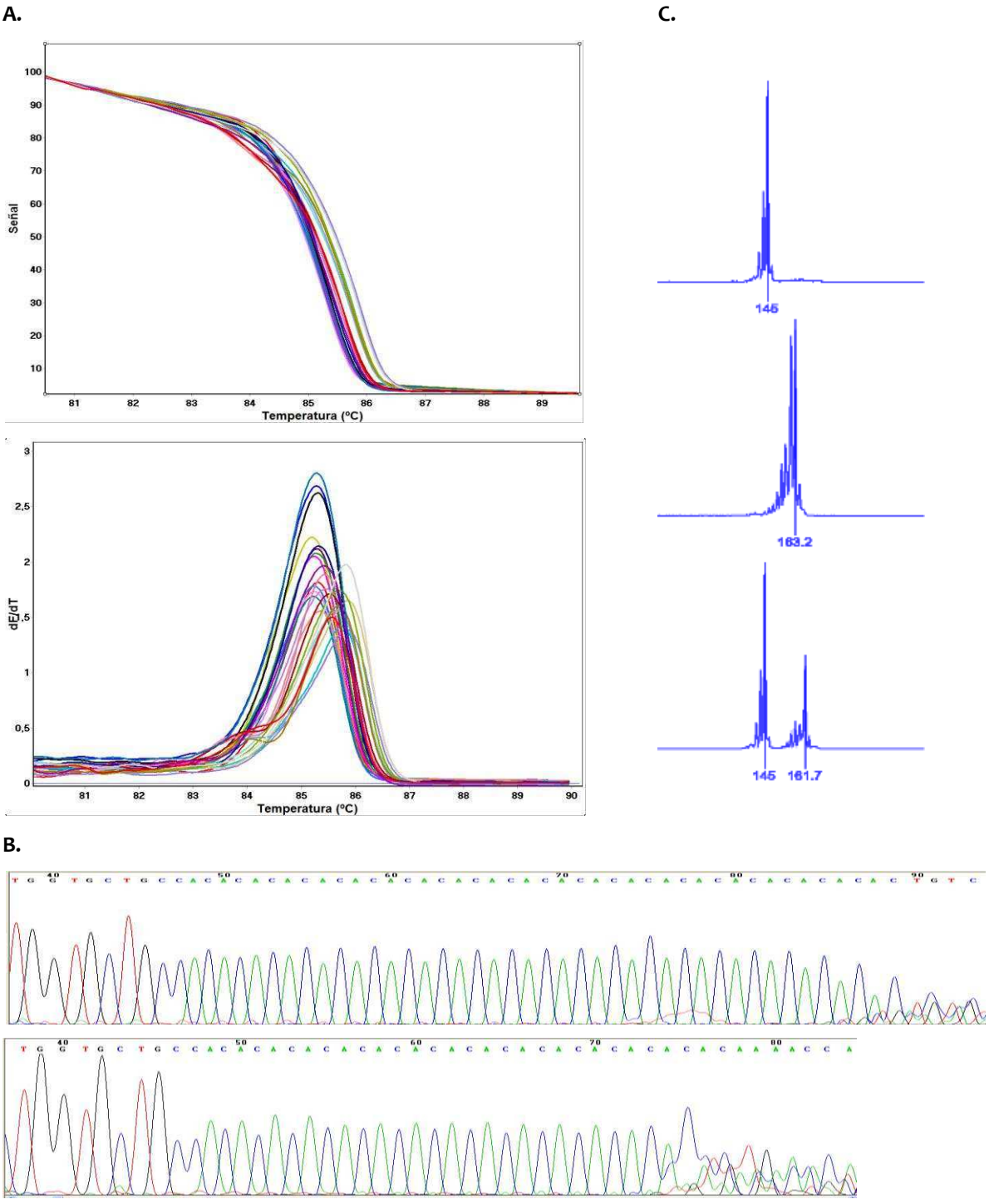


Figura R17. Técnicas para la determinación de genotipos en rs2234681.

Curvas de normalización de fluorescencia (panel superior) y de disociación (panel inferior) obtenidas por HRMA (A). Cromatogramas pertenecientes a las secuencias de dos individuos con distinto número de repeticiones de CA (B). Picos correspondientes a la técnica de electroforesis capilar utilizando un cebador marcado radiactivamente (C).

3. Análisis de asociación de polimorfismos y la infección congénita

3.1. Distribución de frecuencias genotípicas y alélicas

Las frecuencias genotípicas y alélicas tanto en el grupo de niños sin infección (NIC) como de los que presentaron infección congénita (IC) se encontraron en Equilibrio de Hardy-Weinberg en todos los polimorfismos estudiados (Tabla R5).

Gen	SNP	IC	NIC
ALPP	**rs2014683**	0.8292	0.5439
ADAM12	**rs11244787**	0.1	0.1444
	rs1871054	0.2682	0.4329
MMP2	**rs243866**	0.87	1.0
	rs243865	0.3188	0.2337
	rs17859821	0.7665	0.8173
	rs243864	0.5275	0.3698
	rs2285053	0.1084	1.0
MMP9	**rs3918242**	1.0	0.4509
	rs2234681	0.0642	0.1466

Tabla R5. Valores de p para el equilibrio de Hardy- Weinberg de las frecuencias alélicas poblacionales de los SNPs estudiados.

Una vez realizado el control de calidad de los datos, se evaluó la asociación entre los genotipos de un SNP y el fenotipo estudiado, en este caso la infección congénita de *T. cruzi,* a través de un análisis utilizando el software PLINK V1.07. Mediante la tabla de contingencia 3x3, se evaluó la asociación entre el SNP y la existencia de infección congénita. Para corroborar la hipótesis nula de no asociación entre genotipos e infección congénita, se llevó a cabo un análisis estándar del tipo caso-control mediante un test de χ^2 con 2 grados de libertad y, en aquellos casos donde las frecuencias genotípicas eran pequeñas (menor de 5) en una o más de una celda, se realizó test exacto de Fisher. Con este análisis las distribuciones de las frecuencias alélicas (Tabla R6) y genotípicas (Tabla R7) de **rs2014683** (*ALPP*), **rs243865** y **rs243864** (*MMP2*), **rs3918242** y **rs2234681** (*MMP9*) resultaron similares entre los individuos de los grupos NIC e IC (p >0,05).

Gen	SNP	A_1: A_2	MAF	FA (A_1/A_2)		p^a
				IC	NIC	
ALPP	**rs2014683**	G:A	0,263	45/157	69/163	0,078
ADAM12	**rs11244787**	G:A	0,332	82/120	62/170	0,002**
	rs1871054	T:C	0,412	60/142	119/113	5,2E-03**
MMP2	**rs243866**	A:G	0,127	53/149	2/230	2,3E-12*
	rs243865	T:C	0,279	52/150	69/163	0,354
	rs17859821	A:G	0,191	50/152	33/199	0,005**
	rs243864	G:T	0,318	58/144	80/152	0,198
	rs2285053	T:C	0,173	44/158	31/201	0,021*
MMP9	**rs3918242**	T:C	0,088	17/185	21/211	0,815
	rs2234681	H:L	0,376	68/134	95/137	0,118

Tabla R6. Distribución de frecuencias genotípicas y alélicas.

Frecuencias absolutas alélicas (FA) en los grupos IC y NIC; A_1: alelo de menor frecuencia; A_2 alelo de mayor frecuencia; Valores de p para los Test χ^2 y test exacto de Fisher comparando alelos (p^a) para cada uno de los SNPs analizados.

***** p<0,05

****** p<0,01

En cambio, los dos polimorfismos correspondientes a *ADAM12* presentaron diferencias significativas en las distribuciones de las frecuencias entre los grupos de estudio. El alelo mutante G en **rs11244787** se vio más representado en el grupo de individuos con infección congénita con una frecuencia alélica relativa de 0,406 mientras que en el grupo sin infección esta frecuencia resultó de 0,267 (p^a = 0,002) (Tabla R6). Por el contrario, el alelo mutante T en **rs1871054** tuvo una frecuencia alélica relativa de 0,297 en el grupo IC menor comparando con el grupo NIC, cuya frecuencia fue 0,513 (p^a = 0,005) (Tabla R6). Estas diferencias también se vieron reflejadas a nivel genotípico (p^g = 0,019, en ambos casos) (Tabla R7). Más aún, el test de 1000 permutaciones también resultó con significancia estadística entre los grupos de estudio para estos dos *loci* polimórficos (p = 0,011 y p = 0,002, para **rs11244787** y **rs1871054,** respectivamente).

Gen	SNP	FG ($A_1A_1/A_1A_2/A_2A_2$)		p^g
		IC	NIC	
ALPP	**rs2014683**	4/37/60	12/45/59	NA
ADAM12	**rs11244787**	21/40/40	13/36/67	0,019*
	rs1871054	6/48/47	33/53/30	0,019*
MMP2	**rs243866**	6/41/54	0/2/114	NA
	rs243865	9/34/58	7/55/54	0,115
	rs17859821	5/40/56	3/27/86	NA
	rs243864	10/38/53	11/58/47	0,169
	rs2285053	8/28/65	2/27/87	NA
MMP9	**rs3918242**	1/15/85	2/17/97	NA
	rs2234681	16/36/49	28/39/49	0,306

Tabla R7. Distribución de frecuencias genotípicas.

Frecuencias absolutas genotípicas (FG) en los grupos IC y NIC; A_1: alelo de menor frecuencia; A_2 alelo de mayor frecuencia; Valores de p para los Test χ^2 y test exacto de Fisher comparando genotipos (p^g) para cada uno de los SNPs analizados. NA: no aplicable.

***** p<0,05

Además de los SNPs en *ADAM12*, tres SNPs en el gen *MMP2* (**rs243866**, **rs17859821** y **rs2285053**) mostraron diferencias en las distribuciones de sus frecuencias alélicas (Tabla R6). El sitio **rs243866** fue el SNP con mayores diferencias en sus frecuencias alélicas: 0,262 y 0,009 para el alelo mutante A en el grupo IC y NIC, respectivamente ($p^a=2E^{-12}$). De igual manera, los alelos mutantes A y T de **rs17859821** y **rs2285053** resultaron sobre-representados en el grupo de niños congénitos (IC = 0,246 y NIC = 0,142, p^a = 0,005; IC = 0,217 y NIC = 0,134, p^a = 0,021, respectivamente).

Aparte del *test* básico de asociación entre fenotipo y alelos, que solo compara frecuencias de alelos en casos vs controles, es posible realizar otros análisis que consideran patrones de herencia como el dominante o el recesivo. Un modelo de herencia dominante asume que es suficiente con poseer un alelo variante para conferir riesgo, mientras que el modelo recesivo considera que es necesario portar las 2 copias del alelo variante para presentar riesgo a la infección. Así, para llevar a cabo el análisis de asociación bajo estos

modelos, basta con reorganizar los datos, reagrupando las frecuencias del heterocigota con la del homocigota recesivo (modelo dominante) con la del homocigota dominante (modelo recesivo).

El análisis de la regresión logística usando el **modelo dominante** (Tabla R8) reveló que los individuos portadores de al menos una copias del alelo de menor frecuencia, guanina, en **rs11244787** de *ADAM12* estaban más representados en el grupo IC comparando con NIC (60,4% y 40,2%, respectivamente p_{ad}=0,008) con un OR_{ad} = 2,08, $CI_{95\%}$: 0,982-4,407, indicando que el alelo G es factor de riesgo en la infección congénita. Por el contrario, los genotipos con al menos una copia del alelo mutante, timina, en **rs1871054** (*ADAM12*) tienen una menor frecuencia en IC que en NIC (53.5%, 74.1%, respectivamente; p_{ad} = 0,002). El valor de OR_{ad} menor a 1 (OR_{ad} =0,159, $CI_{95\%}$: 0,063-0,398), estaría mostrando un efecto protectivo del alelo T en este sitio.

Así mismo, los alelos mutantes A de los *loci* **rs243866** y **rs17859821** en el gen *MMP2* estarían asociados a una mayor susceptibilidad a la transmisión vertical de *T. cruzi* bajo el **modelo dominante**. Para ambos SNPs, los genotipos con el alelo de menor frecuencia estuvieron más representados comparando con el homocigota salvaje en el grupo IC que en el grupo NIC, 46,5% y 1,7% en **rs243866**; 44,6% y 25,9% en **rs17859821**, respectivamente. Ambos resultaron tener OR_{ad} > 1, siendo OR_{ad} = 49,61, CI95%: 11,62-211,8, p_{ad} = $1E^{-04}$ y OR_{ad} = 2,304, CI95%: 1,301-4,08, p_{ad} = 0,004 para **rs243866** y **rs17859821**, respectivamente.

Después de la aplicación de un ajuste a regresión logística bajo el **modelo recesivo** de herencia (Tabla R8), se observó que la probabilidad de los individuos portadores de genotipo TT en **rs2285053** en *MMP2* de desarrollar la infección congénita es 5 veces mayor que aquellos individuos portadores de los genotipos CC y CT (OR_{ad}: 4,903, CI95%: 1,017-23,65, p_{ad} = 0,048).

Gen	SNP	MODELO DOMINANTE		MODELO RECESIVO	
		p_{ad}	OR_{ad} (I95- S95)	p_{ad}	OR_{ad} (I95- S95)
ALPP	**rs2014683**	0,208	0,707 (0,413-1,212)	0,083	0,357 (0,112-1,146)
ADAM12	**rs11244787**	0,008**	2,085 (1,212-3,589)	0,056	2,08 (0,982-4,407)
	rs1871054	0,002**	0,401 (0,227-0,709)	0,086	0,159 (0,063-0,398)
MMP2	**rs243866**	1E-04**	49,61 (11,62-211,8)	0,998	1,97E+12 (NA)
	rs243865	0,111	0,646 (0,377-1,105)	0,421	1,523 (0,546-4,25)
	rs17859821	0,004**	2,304 (1,301-4,08)	0,365	1,962 (0,457-8,422)
	rs243864	0,079	0,617 (0,360-1,057)	0,917	1,049 (0,426-2,583)
	rs2285053	0,089	1,662 (0,926-2,983)	0,048*	4,903 (1,017-23,65)
MMP9	**rs3918242**	0,915	0,961 (0,465-1,986)	0,648	0,57 (0,051-6,381)
	rs2234681	0,354	0,776 (0,454-1,327)	0,132	0,592 (0,299-1,171)

Tabla R8. Regresión logística bajo un modelo de herencia dominante y recesiva. Valores de p ajustados (p_{ad}); *odd ratios* ajustados (OR_{ad}) y los límites inferiores (I95) y superiores (S95) del intervalo de confianza del 95%; NA: No aplica.

***** p<0,05

****** p<0,01

3.2. Análisis de interacción gen-gen

En vista de los resultados obtenidos, la interacción potencial de los polimorfismos de todos los genes estudiados se exploró por medio del abordaje con el programa MDR, del inglés *Multifactor Dimensionality Reduction*. Esta estrategia de exploración de datos no paramétrica y libre de modelos genéticos es una alternativa a la regresión logística que hemos empleado anteriormente, que permite detectar y caracterizar interacciones no lineales entre atributos genéticos discretos y también ambientales. El método de MDR combina atributos de selección, construcción y clasificación con tests de validación cruzada y permutación para proveer un abordaje comprensivo y poderoso en la detección de interacciones no lineales.

Se obtuvieron con este análisis cuatro modelos (Figura R18 y Tabla R9): un modelo de cinco *loci* (**rs11244787/rs1871054/rs243866/rs17859821/rs243864**) con dos SNPs correspondientes a *ADAM12* y tres a *MMP2*. El test de precisión balanceado (BTA) resultó de

un valor de 0,7934 y el valor de consistencia de la validación cruzada (CVC) fue de 9; un modelo de tres *loci* **rs1871054**/**rs243866**/**rs243864** mostró valores de BTA= 0,7805 y CVC=8; un modelo de dos *loci* **rs243866**/**rs243864** arrojó un BTA=0,7102 y CVC=8; y por último, el modelo de un único *locus* **rs243866** resultó con BTA=0,7241 y CVC=10.

Mejor combinación para cada modelo	BTA	CVC	p	OR (I95- S95)
rs243866	0,7241	10	<0,0001	49,61 (0,50-4889)
rs243866,rs243864	0,7102	8	< 0,0001	7,57 (0,94-61,04)
rs1871054,rs243866,rs243864	0,7805	8	< 0,0001	53,89 (18,40-157,83)
rs11244787,rs1871054,rs243866,rs17859821,rs243864	0,7934	9	0,006	17,03 (1,81-159,96)

Tabla R9. Análisis de la interacción gen-gen con MDR.

BTA: del inglés *Balanced Testing accuracy*; CVC: del inglés *Cross-validation consistency*; Odd Ratios (OR) y los límites inferiores (I) y superiores (S) de su intervalo de confianza del 95%.

Todos estos modelos resultaron estadísticamente significativos con el test de 1000 permutaciones ($p < 0,001$) (Tabla R9). En base a los parámetros BTA y CVC, hemos seleccionado el modelo de cinco *loci* como el mejor modelo por su habilidad de clasificar y predecir la infección, reduciendo de 10 a 5 dimensiones a una nueva variable genotípica multilocus (OR=17,03; IC95%: 1,81-159,96).

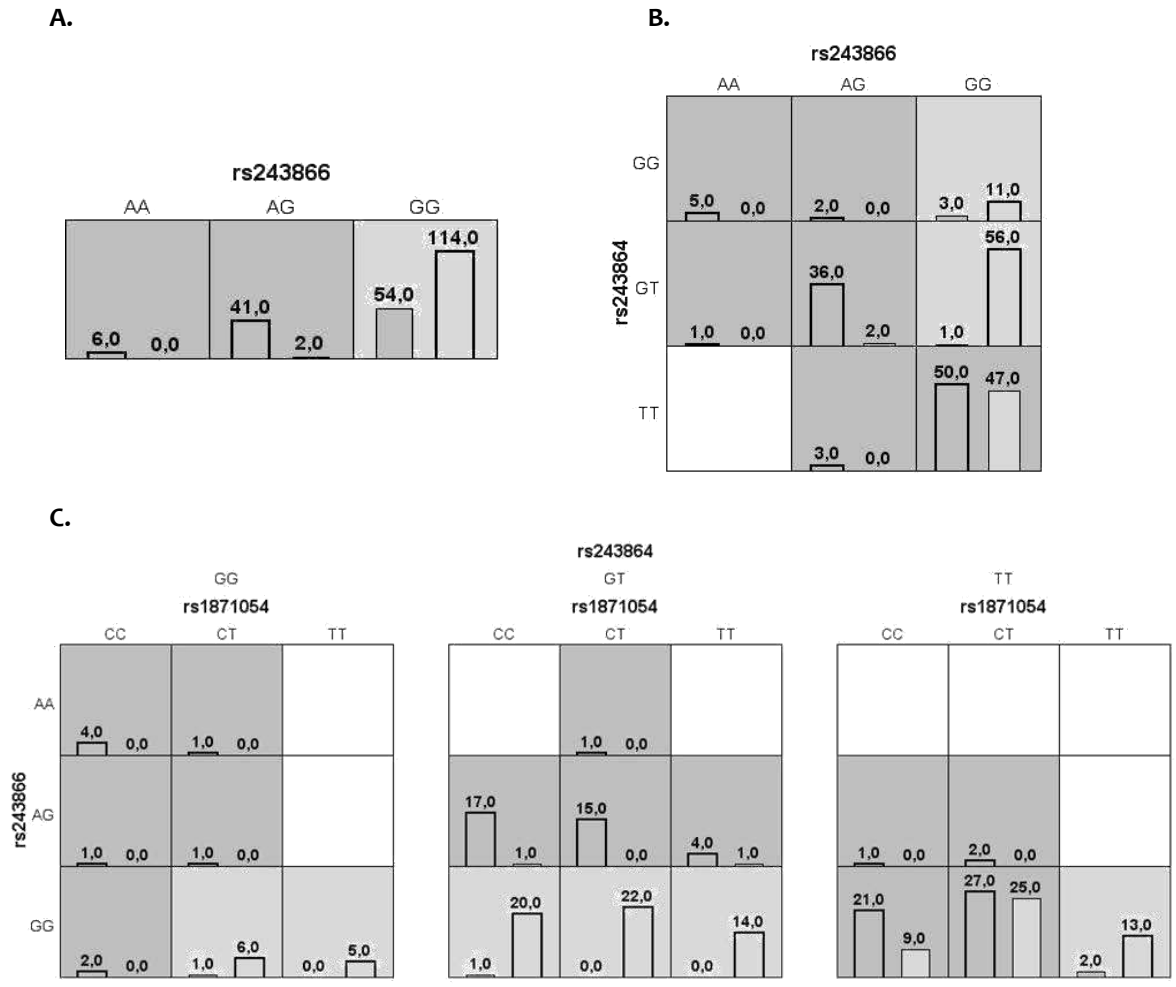


Figura R18. Modelos obtenidos por MDR.

Se muestran tres de los cuatro modelos obtenidos por MDR, (A) de 1 locus (**rs243866**), (B) 2 *loci* (**rs243866,rs243864**) y (C) 3 *loci* (**rs11244787,rs1871054,rs243866,rs17859821,rs243864**). Las celdas en gris oscuro representan grupos de riesgo y las más claras de bajo riesgo. Las celdas blancas representan celdas donde no hay datos disponibles. Las barras indican la distribución hipotética de casos (izquierda) y controles (derecha) para cada combinación multifactorial.

Por último, la ganancia de información o "*information gain*" (IG) también fue evaluada por el método de MDR, de manera de buscar la interacción más fuerte entre SNPs. De esta forma, se encontró que las interacciones más sinérgicas fueron entre **rs17859821/rs2285053** y **rs243866/ rs243864**, con IGs de 4,57% y 2,16%, respectivamente

(Figura R19). Finalmente, el SNP que presentó el efecto individual más fuerte fue **rs243866** (IG=24,14%) correspondiente a *MMP2*.

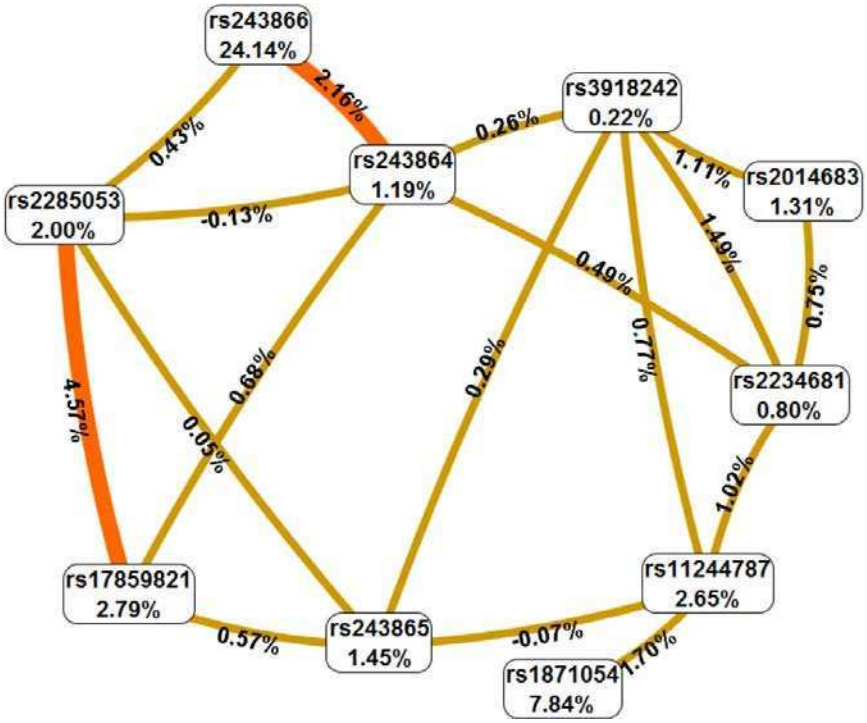


Figura R19. Mapa de Interacción entre los SNPs *ALPP, ADAM12, MMP2* y *MMP9* y la infección congénita. Los valores de IGs de los atributos individuales, o efectos principales, están representados en los nodos, mientras que los IGs de los atributos de cada par, efectos de interacción, se muestran entre nodos (en naranja los valores sinérgicos y en ocre los no significativos).

3.3. Análisis de Haplotipo en la región de *MMP2*

El análisis de haplotipos de SNPs correspondientes a las regiones génicas de *ALPP*, *ADAM12* y *MMP9*, no mostraron ningún tipo de desequilibrio de ligamiento, es decir presentaron una segregación independiente, mientras que si ocurrió en los SNPs en la región promotora de *MMP2*, y por lo tanto el análisis de haplotipos se realizó sólo en este caso.

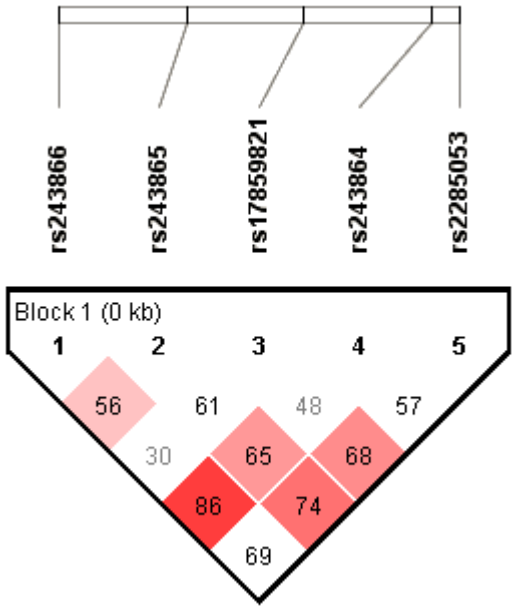


Figura R20. Patrón de desequilibrio de ligamiento de la región genómica en *MMP2* entre los SNPs rs243866, rs243865, rs17859821, rs243864 y rs2285053 en la población de estudio utilizando Haploview.

Las posiciones de los SNPs analizados están indicadas en la parte superior de la figura. El coeficiente de correlación cuadrático (r^2) para cada par de SNPs está indicado con un gradiente donde blanco corresponde a r^2=0 y el rojo r^2=1. Los números en cada uno de los rombos indican las relaciones de desequilibrio de ligamiento, basadas en los valores de D´ (medida de desequilibrio de ligamiento "D" normalizado) multiplicado por 100; D´ se calcula dividiendo a D por el máximo teórico en base a las frecuencias alélicas observadas. Valores cercanos a cero indican ausencia de desequilibrio de ligamiento y valores cercanos a 100 indican completa ligación.

Los cinco SNPs pudieron ser ubicados en un único bloque mostrando cierto nivel de desequilibrio de ligamiento (D´=69) (Figura R20). Comparando los grupos IC y NIC, varios haplotipos mostraron diferencias significativas: GTGGC ($p = 5E^{-10}$), ATGGC ($p = 4E^{-9}$), GCGGC ($p = 1E^{-4}$), ACGGC ($p = 2E^{-4}$), GCGTT (p = 0.044) y GCATC (p = 0.021) (Tabla R10).

Haplotipo	HF_{TOTAL}	CI; NCI	P	p_{per}
GTGGC	0,126	0,020; 0,218	$5E^{-10}$*	<0,001
ATGGC	0,080	0,162; 0,008	$4E^{-9}$*	<0,001
GCGGC	0,060	0,013; 0,102	$1E^{-4}$*	<0,001
ACGGC	0,027	0,059; 0,000	$2E^{-4}$*	0,001
GCGTT	0,043	0,065; 0,025	0,044*	0,123
GCATC	0,038	0,060; 0,018	0,021*	0,256
GCGTC	0,413	0,379; 0,442	0,183	0,802
GTGTC	0,056	0,042; 0,068	0,246	0,913
GCATT	0,114	0,131; 0,099	0,299	0,963

Tabla R10. Distribución de las frecuencias de los haplotipos del *loci* de 5 SNPs en MMP2 en los grupos IC y NIC. Frecuencias totales del haplotipo **rs243866/rs243865/rs17859821/rs243864/rs2285053** (FH_{TOTAL}); frecuencias haplotípicas en grupos IC y NIC; valores de p correspondientes al test exacto de Fisher (p) y valor de p del test de 10 mil permutaciones (p_{per}).

***** p<0,05

Más aún, estas diferencias permanecieron significativas en los primeros cuatro grupos luego del test de 10 mil permutaciones con valores de p ≤ 0,001: los haplotipos ATGGC (IC: 0,162; NIC: 0,008) y ACGGC (IC: 0,059; NIC: 0) tuvieron las frecuencias más altas en el grupo IC respecto a NIC, mientras que las frecuencias de los haplotipos GTGGC (IC: 0,02; NIC: 0,218) y GCGGC (IC: 0,013; NIC: 0,102) fueron mayores dentro del grupo NIC (Tabla R10).

R3

Genes candidatos para marcadores genéticos de Cardiopatía Chagásica Crónica

Se realizó un estudio del tipo caso-control para determinar la asociación entre polimorfismos en genes inmunológicos y la CChC. Con tal fin, se contó con 93 muestras de sangre periférica de pacientes de los siguientes centros: Hospital Italiano, Fundación Favaloro y Hospital Ramos Mejía de Buenos Aires. Además se realizaron distintos operativos en diferentes localidades de dos provincias de alta endemicidad: Río Muerto, Las Hacheras, Misión Nueva Pompeya, Miraflores de la provincia de Chaco y Las Lomitas, Pozo del Tigre, Laguna Yema, Estanislao del Campo de la provincia de Formosa (Figura R21). En estos muestreos se relevaron muestras de individuos pertenecientes a las poblaciones criollas (n = 134) y *wichi* (n = 118). En total se estudiaron 345 muestras de ADN, las cuales fueron divididas en dos grupos: con alteraciones en el ECG (CCD, n = 144) y sin alteraciones (SCD, n = 201).

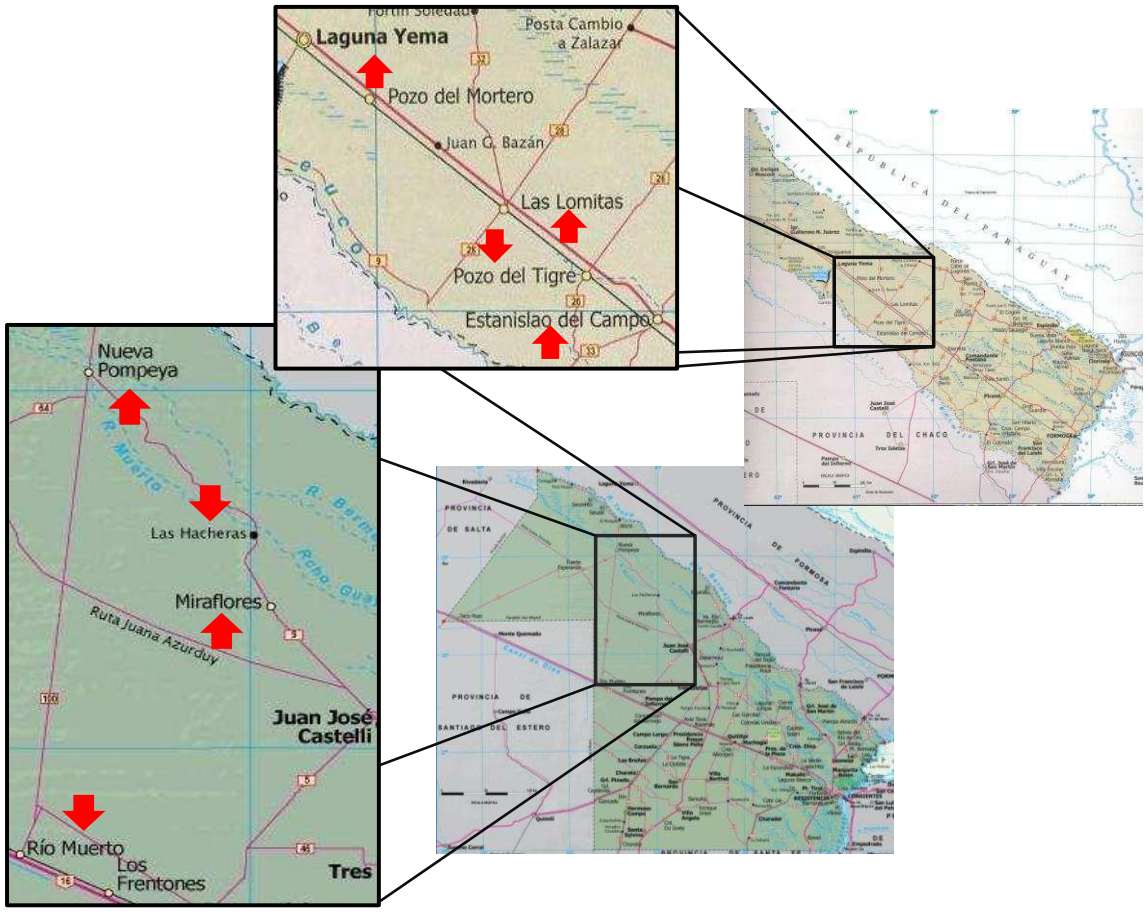


Figura R21: Mapas de las provincias de Chaco (A) y Formosa (B). Las flechas en rojo indican las localidades donde se realizaron los operativos.

1. Poblaciones de estudio y genotipificación

Trabajos recientes del grupo de la Dra. Clara Gonzalez (Flórez y col., 2012; Machuca y col., 2014) demostraron que variantes de los genes para CCR5 y CCR2 se asocian a la CChC en la población colombiana. Con el objetivo de determinar si en la población argentina estas variantes genéticas también se asocian al desarrollo de la cardiopatía chagásica, se genotipificaron las muestras de los pacientes empleando ensayos comerciales de qPCR con sondas TaqMan para los siguientes SNPs: **rs3138042** (*CCR2*), **rs2856758**, **rs2734648, rs1799987, rs1799988, rs41469351, rs1800023** y **rs1800024** (*CCR5*)**.** La Figura R22 muestra un ejemplo de corrida para el SNP **rs2734648**. Para determinar a qué genotipo corresponde cada muestra, a partir de los resultados de la gráfica de amplificación (Figura R22A) se realizó un gráfico de discriminación alélica donde las muestras se ubican en alguno de los cuadrantes según presenten señal para una de las sondas o para ambas (Figura R22B).

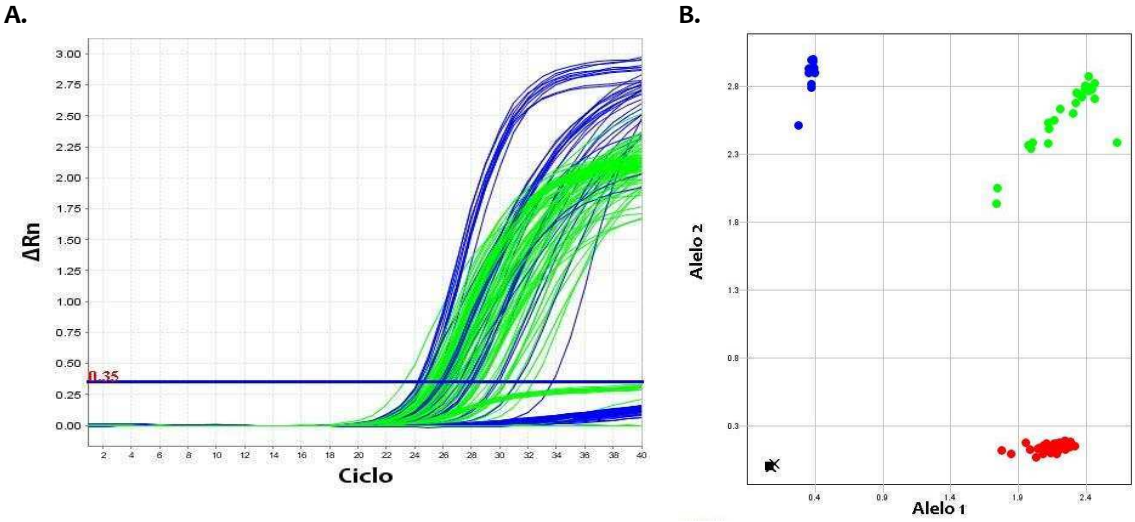


Figura 22. Gráficos de Amplificación (A) y de discriminación alélica (B).

Ejemplo de una corrida de qPCR con sondas TaqMan® del SNP **rs2734648**. En el gráfico de discriminación alélica los puntos verdes representan muestras heterocigotas, los rojos homocigotas para el Alelo 1 y los azules homocigotas para el Alelo 2.

El estudio de las frecuencias alélicas analizando el total de las muestras como una única población, mostró varios sitios polimórficos que no se ajustaban a las frecuencias esperadas bajo el equilibrio de Hardy – Weinberg (Tabla R11). Se decidió, por lo tanto,

agrupar los individuos según la variable "*población*", sean oriundos o no del pueblo originario *wichi*. Al dividir la muestra en ambas poblaciones, en el grupo de individuos *no wichis,* todas las frecuencias alélicas de los SNPs en estudio se ajustaban a las esperadas por equilibrio (Tabla R11), mientras que en el grupo de individuos *wichi*, se encontró equilibrio de Hardy-Weinberg para todos los SNPs estudiados, excepto para **rs3138042** (p = 0,024, Tabla R11).

SNPs	A1:A2	Frecuencias Observadas	Frecuencias Esperadas	p-valor TOTAL	p-valor *no wichi*	p-valor *wichi*
rs3138042	A:G	0,299	0,329	0,123	0,069	0,024*
rs2856758	A:G	0,122	0,124	0,908	1,0	1,0
rs2734648	G:T	0,29	0,33	0,037*	1,0	0,175
rs1799987	A:G	0,325	0,377	0,015*	0,853	1,0
rs1799988	C:T	0,316	0,373	0,008*	0,618	1,0
rs41469351	C:T	0,029	0,029	1,0	1,0	1,0
rs1800023	A:G	0,296	0,317	0,28	0,580	0,164
rs1800024	C:T	0,377	0,47	4,0E-4*	0,802	0,05

Tabla R11. Equilibrio de Hardy-Weinberg en la población total, y en las subpoblaciones en estudio.
***** p<0,05

Se corroboró que las edades en los grupos SCD y CCD en ambas poblaciones fueran homogéneas, mediante un análisis de la varianza no paramétrico, con la prueba de Kruskal Wallis. Si bien ambas poblaciones *wichi* y *no wichi* presentaron diferencias significativas en cuanto a la edad (p <0,0001), las edades entre los grupos SCD y CCD dentro de cada población fueron similares (Tabla R12). Se evaluó por prueba de χ^2 si las frecuencias de hombres y mujeres eran semejantes entre ambos grupos SCD y CCD en la población *no wichi* y *wichi,* no viéndose diferencias significativas (p = 0,433 y p = 0,797, respectivamente).

Variables	*no wichi*		*wichi*	
	SCD	CCD	SCD	CCD
Edad (Media ± DE)	49,97 ± 15,95	52,76 ± 14,71	36,74 ± 14,16	37,60 ± 14,16
Sexo				
Masculino	61	57	39	21
Femenino	62	47	39	19
Total	123	104	78	40

Tabla R12. Caracterización de las poblaciones estudiadas. Los pacientes fueron clasificados en SCD: con ECG normal, CCD: con alteraciones en el ECG.

2. Análisis de asociación de polimorfismos y la CChC

2.1. Distribución de frecuencias genotípicas y alélicas

2.1.1. Población *no wichi*. El único SNP que mostró diferencias significativas en el análisis básico de asociación de alelos fue **rs41469351**. El alelo mutante C para este sitio presentó una baja frecuencia en esta población (MAF = 0,022), no encontrándose muestras homocigotas (A_1A_1). Este alelo mostró ser factor de riesgo para la CChC con una frecuencia 5 veces mayor en el grupo CCD que en SCD, siendo estas 0,04 y 0,008, respectivamente (p^a = 0,028, Tabla R13).

SNP ID	MAF	FA (A1/A2)		p^a	FG (A1A1/A1A2/A2A2)		p^g
		SCD	CCD		SCD	CCD	
rs3138042	0,286	70/176	60/148	0.927	9/52/62	8/44/52	0,994
rs2856758	0,090	24/222	17/191	0.558	1/22/100	1/15/88	NA
rs2734648	0,302	68/178	69/139	0.201	7/54/62	14/41/49	0,131
rs1799987	0,363	85/161	80/128	0.388	13/59/51	18/44/42	0,319
rs1799988	0,357	84/162	78/130	0.457	13/58/52	18/42/44	0,292
rs41469351	0,022	2/244	8/200	0.028*	0/2/121	0/8/96	NA
rs1800023	0,278	64/182	62/146	0.369	6/52/65	9/44/51	0,503
rs1800024	0,242	66/180	44/164	0.160	7/52/64	5/34/65	0,281

Tabla R13. Frecuencias alélicas (FA) y genotípicas (FG) de los SNPs en la región *CCR2* y *CCR5* para la población *no wichi*. Valores p para las asociaciones entre alelos (p^a), genotipos (p^g); SCD: sin cardiopatía detectada; CCD: con cardiopatía detectada.

***** p<0,05.

Así mismo, bajo la hipótesis de dominancia (Tabla R14), en la cual se agrupan los individuos homocigotas CC junto a los hererocigotas CT y se los compara con las frecuencias del homocigota TT, se observó que una sola copia del alelo mutante es suficiente para otorgar susceptibilidad a la CChC, con un OR_{ad} = 5,53 (1,13-26,98) y un valor p de 0,035.Por último, el análisis de regresión logística suponiendo un modelo de herencia recesivo (Tabla R14) dio como resultado que dos copias del alelo mutante G en el *locus* **rs2734648** aumentan el riesgo de adquirir CChC (p = 0,047) con un OR_{ad} = 2,63 (1,02-6,82).

SNP ID	MODELO DOMINANTE		MODELO RECESIVO	
	p_{ad}	OR_{ad} (I95- S95)	p_{ad}	OR_{ad} (I95- S95)
rs3138042	0,850	1,05 (0,62-1,78)	0,785	1,15 (0,42-3,16)
rs2856758	0,493	0,78 (0,39-1,58)	0,945	1,10 (0,07-18,16)
rs2734648	0,592	1,16 (0,68-1,96)	0,047*	2,63 (1,02-6,82)
rs1799987	0,833	1,06 (0,62-1,81)	0,128	1,82 (0,84-3,94)
rs1799988	0,958	1,01 (0,60-1,73)	0,128	1,82 (0,84-3,95)
rs41469351	0,035*	5,53 (1,13-26,98)	NA	NA
rs1800023	0,581	1,16 (0,69-1,97)	0,285	1,80 (0,62-5,25)
rs1800024	0,135	0,66 (0,39-1,14)	0,715	0,80 (0,25- 2,62)

Tabla R14. Regresión logística de los SNPs en la región *CCR2* y *CCR5* para la población *no wichi*. Valores p ajustados (p_{aj}) para la regresión logística bajo los modelos dominante y recesivo. SCD: sin cardiopatía detectada; CCD: con cardiopatía detectada; OR_{aj}: odd ratio ajustado y los límites del intervalo de confianza del 95%, inferior (I) y superior (S).

* p<0,05

2.1.2 Población *wichi*. Los análisis mencionados anteriormente, al ser aplicados en la población *wichi* mostraron que el sitio **rs41469351**, que fue encontrado como factor de riesgo en la población *no wichi*, resultó ser monomórfico. Las pruebas de asociación básica entre alelos y genotipos con el fenotipo estudiado, demostraron en primer lugar que los alelos mutantes G y A de los SNPs **rs2734648** y **rs1800023** (Tabla R15) se encuentran en mayor proporción en los individuos del grupo CCD que en los de SCD (p^a = 0,013 y p^a = 0,033, respectivamente). De igual manera, la comparación de frecuencias genotípicas dio diferencias significativas en ambos *loci* (p^g = 0,014 y p^g = 0,033, respectivamente).

SNP ID	MAF	FA (A1/A2)		p^a	FG (A1A1/A1A2/A2A2)		p^g
		SCD	CCD		SCD	CCD	
rs3138042	0,055	7/149	6/74	0,337	2/3/73	1/4/35	0,606
rs2856758	0,021	5/151	0/80	0,106	0/5/73	0/0/40	0,106
rs2734648	0,03	2/154	5/75	0,033*	0/2/76	1/3/36	0,033*
rs1799987	0,038	5/151	4/76	0,496	0/5/73	0/4/36	0,799
rs1799988	0,038	5/151	4/76	0,496	0/5/73	0/4/36	0,799
rs41469351	0	0/156	0/80	NA	0/0/78	0/0/40	NA
rs1800023	0,042	3/153	7/73	0,013*	0/3/75	2/3/35	0,014*
rs1800024	0,364	60/96	26/54	0,368	16/28/34	5/16/19	0,368

Tabla R15. Frecuencias alélicas (FA) y genotípicas (FG) de los SNPs en la región *CCR2* y *CCR5* para la población *wichi.* Valores p para las asociaciones entre alelos (p^a), genotipos (p^g); SCD: sin cardiopatía detectada; CCD: con cardiopatía detectada.

***** p<0,05.

Finalmente, debido a la baja variabilidad génica observada en esta población, la regresión lineal suponiendo modelos de herencia dominante o recesiva sólo pudo aplicarse en algunos de los casos, y con resultados no significativos (Tabla R16).

SNP ID	MODELO DOMINANTE		MODELO RECESIVO	
	p_{ad}	OR_{ad} (I95- S95)	p_{ad}	OR_{ad} (I95- S95)
rs3138042	0,261	0,47 (0,12-1,76)	0,951	1,08 (1,31-0,08)
rs2856758	0,999	9E11 (0-inf)	NA	NA
rs2734648	0,102	0,23 (0,04-1,34)	0,999	3E-7 (0-inf)
rs1799987	0,451	0,59 (0,15-2,36)	NA	NA
rs1799988	0,451	0,59 (0,15-2,36)	NA	NA
rs41469351	NA	NA	NA	NA
rs1800023	0,087	0,27 (0,06-1,21)	0,999	3E-7 (0-inf)
rs1800024	0,704	1,16 (0,54-2,50)	0,298	1,78 (0,56-5,31)

Tabla R16. Regresión logística de los SNPs en la región *CCR2* y *CCR5* para la población *wichi.* Valores p ajustados (p_{aj}) para la regresión logística bajo los modelos dominante y recesivo. SCD: sin cardiopatía detectada; CCD: con cardiopatía detectada; OR_{aj}: odd ratio ajustado y los límites del intervalo de confianza del 95%, inferior (I) y superior (S).

2.2. Análisis de Haplotipos en la región de los genes *CCR2/CCR5*

Además del estudio de asociación de cada sitio polimórfico en particular, se realizó un análisis de haplotipos mediante el software Haploview para evaluar la presencia de desequilibrio de ligamiento entre pares de *loci.*

A pesar de que en la población *no wichi* se observó un claro desequilibrio de ligamiento entre *loci* (Figura R23A), ninguno de los haplotipos del bloque formado mostró diferencias significativas entre los grupos SCD y CCD.

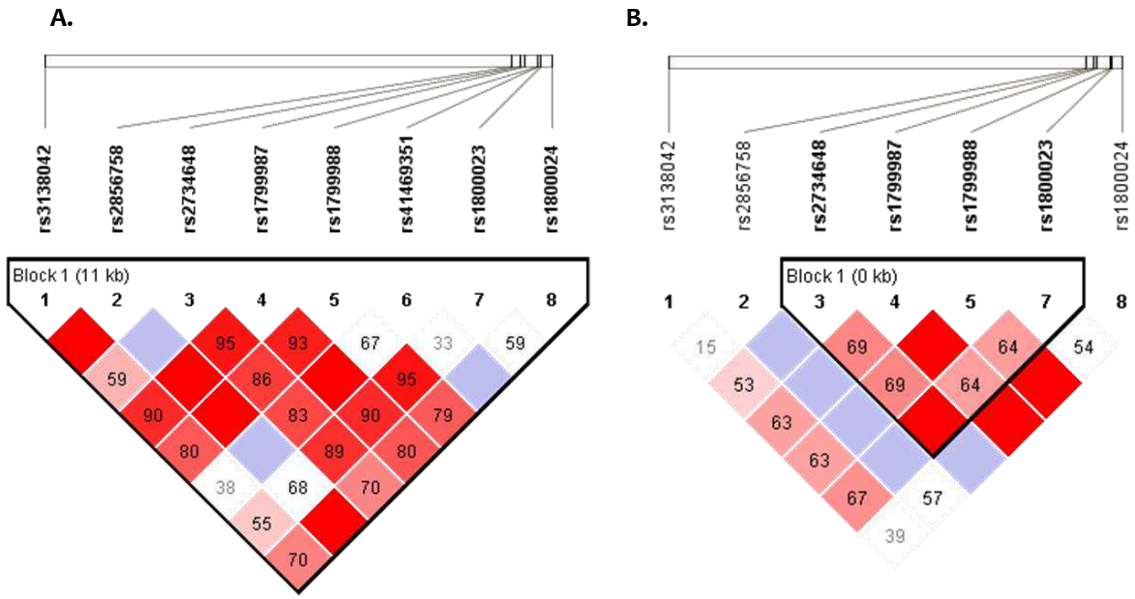


Figura R23. Gráfico de desequilibrio de ligamiento o LD plot en la región de los genes CCR2/CCR5 para la población *no wichi* (A) y *wichi* (B).

Las posiciones de los SNPs analizados están indicadas en la parte superior de la figura. El coeficiente de correlación cuadrático (r^2) para cada par de SNPs está indicado con un gradiente donde blanco corresponde a r^2=0 y el rojo r^2=1. Los números en cada uno de los rombos indican las relaciones de desequilibrio de ligamiento, basadas en los valores de D´ (medida de desequilibrio de ligamiento "D" normalizado) multiplicado por 100; D´ se calcula dividiendo a D por el máximo teórico en base a las frecuencias alélicas observadas. Valores cercanos a cero indican ausencia de desequilibrio de ligamiento y valores cercanos a 100 indican completa ligación.

En cambio, en la población *wichi* se conformó un bloque de alto desequilibrio de ligamiento formado por los *loci* **rs2734648**, **rs1799987**, **rs1799988** y **rs1800023** (Figura R23B).

Haplotipo	Frecuencia	CCD; SCD	p
GACA	0,945	0,968; 0,900	0,031*
TGTG	0,021	0,013; 0,037	0,214
GGTA	0,013	0,013; 0,013	0,981

Tabla R17. Distribución de Haplotipos para los sitios rs2734648, rs1799987, rs1799988 y rs1800023 en población *wichi.*

***** p<0,05

En este bloque, sí se observaron diferencias entre el grupo con y sin patología demostrada, siendo que la combinación de alelos GACA tuvo mayor frecuencia en el grupo CCD que en el SCD (p = 0,031, Tabla R17).

DISCUSIÓN

La enfermedad de Chagas es producto de una compleja interacción entre factores ambientales, del parásito y del hospedero. Esta Tesis doctoral se centró en la detección e identificación de factores del hospedero que presentaran asociaciones con la ocurrencia de la transmisión de Chagas congénito, y con la Cardiopatía chagásica crónica, ya que representan dos escenarios de la infección por *T. cruzi* de alto impacto en salud pública y para los cuales es necesario caracterizar los mecanismos involucrados.

1. Expresión génica en el microambiente placentario en modelo experimental de infección crónica con distintos genotipos de *T. cruzi*

Poco se conoce sobre cómo la infección por *T. cruzi* afecta a la placenta, barrera principal para proteger al feto de las infecciones maternas.

En el presente trabajo, hemos explorado los efectos de la infección por *T. cruzi* en el microambiente placentario a través de un análisis de la expresión génica en un modelo murino de persistencia parasitaria. Nuestro trabajo también ha combinado los datos transcriptómicos con el análisis de redes biológicas con el objetivo de determinar las diferencias entre las respuestas del microambiente placentario generadas ante la infección con genotipos de *T. cruzi* que presentan características polares respecto a la infección congénita.

1.1. Genotipos de *T. cruzi* y tropismo placentario

Hemos observado mayores niveles de parásitos en el torrente sanguíneo de las hembras C57BL/6J infectadas con K98 alrededor de los 48 días post-infección en comparación con VD. Estos hallazgos son consistentes con otros previos de nuestro grupo colaborador que mostraron parasitemias mayores en hembras de ratones C3H/HeN infectadas con K98 (44 días post-inoculación) que con RA (TcVI, Solana y col., 2002). En ambos trabajos se partió de un inóculo de infección mayor en la cepa K98, debido a su menor grado de virulencia respecto a otras cepas utilizadas. A pesar de que esto último podría tener efectos en la carga de parásitos en sangre, Solana y col. (2002) explican esta diferencia de parasitemia a una menor capacidad de K98 de inducir la producción de

anticuerpos líticos y neutralizantes, mientras que RA si puede provocar la liberación de anticuerpos capaces de controlar el número de parásitos (Muller y col., 1986; Muller y González Cappa, 1987; Celentano y González Cappa, 1992).

El tropismo diferencial hacia la placenta de distintas cepas de *T. cruzi* ya ha sido descripto (Risso y col., 2004). Nuestros resultados mostraron que en los animales infectados con VD se produjo un aumento de 124 veces comparando los valores de carga parasitaria en tejido de placenta con aquellos en sangre materna. En cambio, a pesar de la mayor carga parasitaria determinada en sangre materna en el grupo K98 con respecto al VD, no hemos encontrado diferencias significativas entre la carga sanguínea y la del tejido placentario de estos animales, lo que sugiere un tropismo pobre de K98 hacia la placenta. Por el contrario, hemos observado que VD presentaría un significativo tropismo placentario, puesto que los resultados en el grupo VD mostraron un aumento de aproximadamente 40 veces tanto en la expresión del ARNr 18S como en la carga parasitaria en dicho tejido con respecto a K98. Más aún, nuestros resultados de histopatología mostraron que la barrera placentaria resultó intacta en la infección con K98, mientras que en VD hubo destrucción y desprendimiento del espongiotrofoblasto. Siendo que la cepa VD fue aislada de un caso humano de infección congénita (Mirkin y col., 1997), es posible hipotetizar que dicha transmisión congénita ha ocurrido como consecuencia de una importante presencia parasitaria en la placenta y una mayor probabilidad del paso de parásitos hacia el feto por ruptura de la barrera placentaria.

Por último, hemos corroborado por medio de los perfiles de minicírculos y del análisis de polimorfismo de distintos *loci* de microsatélites que ambos stocks, K98 y VD, son monoclonales y, por lo tanto no habría diferencias en la constitución genética entre las poblaciones de parásitos encontradas en el torrente sanguíneo materno y el tejido placentario.

1.2. Genes de expresión diferencial comunes a ambas cepas de *T. cruzi*

Hemos observado que varios genes se ven afectados en su transcripción tanto por encima como por debajo de la condición sin infección, en ambos grupos de animales infectados. Un primer enfoque analizando genes que se encuentran sub-representados en

ambos grupos, es decir con un FC ≤ -1,5, mostró la regulación negativa del gránulo secretorio, en el cual las granzimas juegan un rol fundamental. En concordancia con estos hallazgos, trabajos previos han observado una menor expresión de estas enzimas en células NK fetales extraídas de cordón umbilical de recién nacidos infectados congénitamente con *T. cruzi* como mecanismo de modulación de la respuesta inmune (Hermann y col., 2006).

Así mismo, hemos ampliado el estudio mediante un análisis de Clase Funcional por Puntuación, en el cual además de tener en cuenta los grandes cambios en genes individuales que pueden tener efectos significativos en vías metabólicas, también se considera que los cambios sutiles y coordinados dentro de conjuntos de genes relacionados funcionalmente (es decir, que conforman dichas vías) también pueden causar un impacto significativo. Gracias a la aplicación de GSEA utilizando el conjunto de datos de Procesos Biológicos de GO, hemos hallado que los procesos metabólicos así como los mecanismos de transcripción y el transporte macromolecular fueron regulados de forma negativa en el microambiente placentario de los animales infectados por ambos genotipos parasitarios. Estos datos podrían aportar al estudio de los mecanismos que conducen al retraso en el crecimiento fetal observado en ratones hembras infectadas por *T. cruzi* (Carlier y col., 1987 y Truyens y col., 2005b). Así mismo, los depósitos de fibrinoides encontrados en los estudios histológicos en las placentas de los grupos infectados, que probablemente estarían alterando la relación entre la circulación materna y fetal, podrían explicar este efecto.

Otro hallazgo interesante de nuestro análisis fue la disminución en la regulación de la apoptosis observada en los órganos placentarios de animales infectados por ambas cepas. La prevención de la apoptosis puede ser un mecanismo utilizado por el parásito para persistir durante el desarrollo de la infección reduciendo el daño potencial del hospedero, como ya se ha observado en cardiomiocitos (Petersen y col., 2006).

Con este último enfoque que analiza pequeños cambios en la expresión génica, hemos encontrado que ambas cepas producen una fuerte respuesta inmune. Sin embargo, este efecto no se pudo observar en K98 por el análisis de sobre-representación, que tiene en cuenta sólo aquellos genes expresados de forma diferencial. Es por ello, que la realización

de estos dos análisis aporta información diferente y que ambas deben ser tenidas en cuenta a la hora de generar futuras hipótesis.

1.3. Genes de expresión diferencial entre ambas cepas de *T. cruzi*

Los mecanismos que utiliza *T. cruzi* para infectar células de mamíferos pueden ser diferentes dependiendo de la cepa del parásito (Maeda y col., 2012). En este estudio, hemos encontrado que la respuesta inmune innata fue una red altamente sobre-representada en el microambiente placentario de animales infectados con la cepa VD, pero no en los genes sobre-representados en K98. Muchos de los genes de esta red se encontraron formando parte de la red de respuesta a IFN-γ, un mecanismo esencial para el control de la supervivencia y proliferación de patógenos intracelulares. En varias especies de mamíferos el trofoblasto, así como también las células endometriales, son capaces de sintetizar uno o más tipos de interferones y si bien el IFN-γ es producido principalmente por las células NK, en las células gigantes del trofoblasto de ratones también se detecta esta citoquina (Platt y Hunt, 1998). Es por ello que aunque en nuestras muestras es factible la presencia de células blancas provenientes de la circulación materna, a pesar de los recaudos tomados, y del infiltrado inflamatorio observado en placentas del grupo VD en el análisis histológico, no descartamos que las diferencias encontradas en la expresión génica se deban a células trofoblásticas. Por este motivo, hemos decidido referirnos a las muestras como *microambiente placentario*, contemplando los distintos tipos celulares.

Entre los genes que participan en la red de respuesta a IFN-γ se encontró que tres miembros de la familia de proteínas de unión a guanilato mostraron FCs mayores a 3: GBP2, GBP3 y GBP6. A pesar de que *T. cruzi* posee un mecanismo de invasión celular diferente al de *Toxoplasma gondii* -también protozoo intracelular- es interesante destacar que éste produce un reclutamiento de GBPs en vacuolas parasitóforas, donde cada GBP tiene un papel específico en la resistencia del hospedero dependiendo de la virulencia de las cepas implicadas (Virreira Winter y col., 2011 y Yamamoto y col., 2012). El trabajo de Virreira Winter (2011) reportó la localización de GBP1 murina en la vacuola parasitófora en la infección por *T. gondii,* pero no con *T. cruzi*. Sin embargo, ese trabajo no estudió qué ocurría con las GBPs

que nosotros hemos encontrado reguladas positivamente en su expresión por la cepa VD. Se podría concluir que estas proteínas no funcionan como reguladores generales de la fagocitosis y la degradación del fagosoma, sino que tienen una respuesta específica a diferentes patógenos intracelulares.

Los datos transcriptómicos en placentas infectadas con VD mostraron también la regulación positiva de los genes *H2-Aa* y *H2-Eb1,* los cuales participan en eventos de procesamiento y presentación de antígenos peptídicos, resultados que fueron validados por RT-qPCR dirigidos a los genes mencionados.

Además, hemos encontrado por GSEA que ambos genotipos de *T. cruzi* tuvieron un efecto distinto sobre la cascada de la proteinquinasa, así como en la vía de señalización del receptor acoplado a proteína G, reguladas positivamente en el microambiente placentario de animales infectados con VD y negativamente con K98. Se conoce que la inhibición de las proteinquinasas disminuye significativamente la infección de los macrófagos por *T. cruzi* (Vieira y col., 1994) y que esto mismo ocurre con los receptores de proquineticina en células de mamíferos -receptores acoplados a proteína G- (Khusal y col., 2015). Por otra parte, se ha descripto que la cepa RA de *T. cruzi* activa la proteinquinasa C del hospedero, favoreciendo la infección (Belaunzarán y col., 2007). Por lo tanto, existen dos posibilidades: o bien la alta cantidad de parásitos de la cepa VD en el microambiente placentario provoca una regulación positiva, o debido a la regulación positiva se favorece que haya más parásitos y, de forma contraria ocurriría en K98.

La placenta es un entorno complejo donde la madre y el feto interactúan coordinadamente y, durante una infección, la presencia del patógeno añade complejidad mediante la alteración de los circuitos inmuno-reguladores. Para nuestro conocimiento, el presente estudio es el primero en describir la respuesta genética del microambiente placentario a la infección por *T. cruzi* y en revelar que la fuerte respuesta inmune que se genera en el hospedero va en detrimento de las vías de metabolismo celular. Por otra parte, hemos encontrado que este efecto puede ser modulado por el genotipo del parásito. Son necesarios otros estudios para profundizar la caracterización de esta respuesta, tanto a nivel

genético como a nivel de proteínas, que lleven a la comprensión de los mecanismos que causan la infección congénita de *T. cruzi*.

2. Genes candidatos para marcadores genéticos de infección congénita de *T. cruzi*

En el marco de esta tesis, hemos examinado la asociación de 11 SNPs localizados en 4 genes que codifican para enzimas de expresión placentaria, como marcadores genéticos de susceptibilidad a la infección congénita de *T. cruzi*, a saber: **rs2014683** y **rs1048988** de *ALPP*, **rs11244787** y **rs1871054** de *ADAM12*, **rs243866**, **rs243865**, **rs17859821**, **rs243864** y **rs2285053** de *MMP2* y **rs3918242** y **rs2234681** de *MMP9*.

2.1. Factores Placentarios

2.1.1. MMPs. Las proteínas MMP forman parte de una familia de enzimas dependientes de zinc capaces de escindir componentes de la matriz extracelular, jugando de esta manera un importante rol en las infecciones placentarias.

Dos de los 5 SNPs que estudiamos, son variantes del promotor del gen *MMP2* en las posiciones -1306 (**rs243865**) y -790 (**rs243864**) que se han asignado como elementos que actúan en cis junto a la posición +220 (Price y col., 2001). La caracterización funcional de estas variantes del promotor mostró que la transición común C>T en la posición -1306 interrumpe un sitio de unión para Sp1 (caja CCACC), que provoca una menor actividad del promotor. Al igual que **rs243865,** el SNP **rs2285053**, que es también una transición C>T y se encuentra en la posición -735, también interrumpe un sitio de unión al Sp1 disminuyendo la actividad del promotor (Vasků y col., 2002; Yu y col., 2004). Esta transición ha sido asociada a distintos tipos de cáncer (Yu y col., 2002; Zhou y col., 2004; Ting y col. 2013; Sharma y col., 2012) y a otras enfermedades (Korkmaz y col., 2014; Ortak y col., 2013; Belo y col., 2013), lo cual evidencia la funcionalidad de esta variante.

El SNP **rs243866**, que se encuentra inmediatamente río arriba de una región palindrómica en *MMP2*, es un potencial sitio de unión del receptor de estrógenos (Harendza y col., 2003). Ya ha sido descripto que en células MCF-7 positivas para el receptor de estrógenos, el alelo G funciona como un potenciador o "*enhancer*", mientras que el alelo A reduce la actividad transcripcional. A pesar de que no se lo ha involucrado a ningún sitio de unión de factores de transcripción conocido, se ha observado que éste SNP mejora la sobrevida de falla cardíaca sistólica (Hua y col., 2009 a y b; Morgan y col., 2011). Más aún, el alelo mutante en **rs243866,** al igual que en **rs2285053**, disminuye la actividad transcripcional de *MMP2.*

En nuestra población de estudio hemos observado que se requieren dos copias del alelo T en el sitio **rs2285053** para conferir mayor susceptibilidad a la adquisición de la infección por vía vertical. Además, los SNPs **rs243866**, **rs17859821** y **rs2285053** tuvieron frecuencias alélicas distintas entre los grupos de niños IC e NIC. En base a los resultados de regresión logística bajo los modelos dominante y recesivo, podemos concluir que en los SNPs **rs243866** y **rs17859821** una o dos copias del alelo mutante, "A", en ambos casos, son suficientes para aumentar el riesgo de infección congénita.

Estas proteasas no sólo participan en el proceso de infección por degradación de las moléculas de la matriz extracelular, sino que también degradan epitopes crípticos y actúan sobre varias biomoléculas, regulando así la respuesta inflamatoria e inmune, que es requerida para la defensa contra eventuales patógenos (Geurts y col., 2012). En este sentido, una disminución en la transcripción de *MMP2* podría producir una reducción en la respuesta inmune que favorecería la susceptibilidad a la infección. Además, hemos demostrado que existen diferencias estadísticamente significativas en la distribución de algunos haplogrupos para *MMP2* entre los grupos de niños con y sin infección congénita.

Dentro de los polimorfismos situados en la región promotora del gen *MMP9*, hemos seleccionado dos que habían sido descriptos como funcionales (Ye, 2000): uno es un microsatelite de repeticiones de dinucleótidos CA en la posición -90 (**rs2234681**) y el otro es una sustitución de nucleótido simple C>T, **rs3918242.** El primero es un polimorfismo

multialélico, cuyo contenido en repeticiones de CA está altamente relacionado a la actividad transcripcional del promotor de *MMP9*, debido a un aumento de la afinidad de unión de ciertas proteína(s) con el promotor (St Jean y col., 1995; Shimajiri y col., 1999; Huang y col., 2003). A este polimorfismo se lo ha asociado a problemas cardíacos (Fiotti y col., 2011) y renales (Hirakawa y col., 2003).

En cuanto al SNP **rs3918242**, estudios *in vitro* han demostrado que la sustitución C>T en la región promotora resulta en una pérdida del sitio de reconocimiento de una proteína nuclear represora de la transcripción (Zhang y col., 1999). A pesar de que ya existen estudios de asociación entre esta mutación y un gran número de enfermedades como son la preeclampsia (Rahimi y col., 2013) y el cáncer gástrico (Lee y col., 2013), nosotros no pudimos hallar diferencias en las frecuencias genotípicas o alélicas entre los niños con y sin infección congénita.

2.1.2. ADAM12. Esta es una proteasa de unión a membrana dependiente de zinc de la familia de las proteínas ADAM, un grupo de proteínas involucradas en las interacciones célula-célula y célula-matriz, jugando un papel fundamental en reacciones inflamatorias e inmunes, fertilización, desarrollo muscular y neurogénesis. Se conocen para este gen dos variantes de transcriptos debido a *splicing* alternativo, una variante corta que es secretada y una variante de mayor longitud que se une a membrana.

Las concentraciones plasmáticas de ADAM12 se encuentran alteradas en ciertos desórdenes relacionados al embarazo, y por esta razón se ha considerado a esta proteína como un marcador muy útil en la trisomía 21 y 18, así como también en preeclampsia (Grill y col., 2009) y embarazo ectópico (Rausch y col., 2012). Sumado a esto, ADAM12 funciona como un mecanismo independiente de su actividad como proteasa que facilita la activación de la señalización del factor de crecimiento transformante β (TGF-β), la cual culmina con la activación transcripcional. Este TGF-β está implicado en la invasión de *T. cruzi* a la célula hospedera mamífera (Ming y col., 1995), ya que su presencia en tejidos infectados mejora la eficiencia de invasión de forma directa incrementando la susceptibilidad a la infección e

indirectamente al contrarrestar los efectos de las citoquinas antiparasitarias (Hall y col., 2000).

Nuestra investigación ha revelado una importante asociación entre los SNPs analizados en ADAM12 y la transmisión vertical; los SNPs **rs11244787** y **rs1871054** difieren entre los niños con y sin infección congénita, comparando tanto frecuencias genotípicas como alélicas y considerando regresión logística bajo el modelo dominante. Al realizarse la regresión logística bajo el modelo recesivo, el efecto protector del alelo mutante T en **rs1871054** fue también significativo, lo que no sucedió para el SNP **rs11244787**. Asimismo, estos SNPs son marcadores de riesgo en otras enfermedades: por ejemplo, la variante **rs11244787** confiere susceptibilidad a la enfermedad de Alzheimer (Harold y col., 2007; Laumet y col., 2010) y la variante **rs1871054** está asociada con riesgo a osteoartritis de rodilla (Wang y col., 2015).

2.1.3. PLAP. Por último, hemos seleccionado como candidato al gen *ALPP*, que codifica para la fosfatasa alcalina placentaria, en base a trabajos publicados que demuestran que la actividad de esta proteína se encuentra disminuida en sincitiotrofoblasto de placentas chagásicas (Fretes y col., 1990 a) y en células HEp2 co-cultivadas con *T. cruzi* (Sartori y col., 2003).

Nuestros resultados no han logrado vislumbrar una asociación entre los polimorfismos en este gen y la infección congénita. Sin embargo, algunos autores (Bellazi y col., 2010; Lucarelli y col., 1982) han demostrado que las variantes alélicas en **rs1048988** difieren en los niveles de ARNm, siendo que el alelo C presenta un nivel significativamente menor de transcripción que el alelo G. También se ha sugerido un posible desequilibrio de ligamiento de este *locus* con la secuencia correspondiente a **rs2014683** en la región promotora. Esta última presenta un patrón de unión específico a proteínas nucleares placentarias. Nuestros resultados no han podido respaldar esta hipótesis de ligamiento ya que mientras **rs2014683** fue polimórfico en la población estudiada, **rs1048988** no lo fue (MAF=0,263, Tabla R4).

2.2. Interacción gen-gen

Estudios recientes han propuesto que las interacciones gen-gen representan un componente ubicuo de la arquitectura genética de enfermedades comunes (Hahn y col., 2003). Nosotros realizamos un abordaje utilizando análisis de reducción de dimensionalidad multifactorial para identificar modelos de interacciones del tipo SNP-SNP que difieran entre los grupos de niños con y sin infección congénita.

Este análisis reveló que el **rs243866** solo es un buen predictor de susceptibilidad a contraer infección congénita, con un 100% de consistencia en la validación cruzada. Sin embargo, la genotipificación de los cinco sitios **rs11244787**, **rs1871054** (*ADAM12*), **rs243866**, **rs17859821** y **rs243864** (*MMP2*) podría ser más útil para esta predicción, debido a su mayor precisión en el *test* de balanceado, reduciendo a la mitad las variables de este estudio.

2.3. Técnicas de genotipificación de SNPs

A pesar de que la técnica *gold standard* de diagnóstico de mutaciones puntuales es la secuenciación de genes, esta implica una laboriosa preparación de la muestra a secuenciar y en general requiere contratar un servicio de terceros especializado, con costos algo elevados. Otro método aplicable y que ha sido utilizado en el marco de esta tesis, es la genotipificaión por qPCR mediantes sondas TaqMAN. Este es sencillo operativamente pero los costos de las sondas con fluorocromos son elevados. Nuestro trabajo mostró que la técnica de genotipificación por HRM permite una identificación rápida, sensible, específica y rentable de polimorfismos de una sola base en secuencias de ADN amplificadas. Más aún, los ensayos de HRM pueden ser utilizados de forma eficiente en la genotipificación de muestras en estudios de asociación, de forma alternativa a la PCR-RFLP, técnica utilizada hasta el momento para caracterizar los SNPs estudiados. A pesar de que ya se ha descripto que el análisis de HRM puede ser utilizado para analizar variantes de microsatélites (Distefano y col., 2012; Nicklas y col., 2012), nosotros no hemos logrado implementarlo para la genotipificación en la región flanqueante 5´ del gen *MMP9*; probablemente esto se deba al gran número de alelos (once) que dificulta la resolución de las curvas de disociación. Por ello, la electroforesis capilar utilizando un oligonucleótido cebador marcado resultó una

alternativa interesante a la electroforesis en gel de poliacrilamida con urea seguida de tinción con plata, que ha sido empleada en otros trabajos (Metzger y col., 2012).

Debido a la baja frecuencia de casos congénitos, con una tasa de transmisión vertical de aproximadamente 4,7% (Howard y col., 2014) y sumando las dificultades en el seguimiento para la confirmación de la infección congénita, el tamaño muestral de nuestro estudio es limitado. Por esta razón, es fundamental la confirmación de nuestros hallazgos en cohortes independientes de mayor tamaño. Al ser un estudio de asociación, no podemos descartar la presencia de posibles desequilibrios de ligamiento con otros genes vecinos que puedan explicar la asociación significativa encontrada con la infección congénita. Además, se trata de un estudio principalmente retrospectivo, por lo que los resultados deberían ser validados de forma prospectiva.

A pesar de la fuerte asociación encontrada entre la infección congénita y polimorfismos humanos de genes relacionados con mecanismos de remodelación de la matriz extracelular en la placenta, no observamos que estos mecanismos estuvieran afectados en su expresión génica entre ratones hembras infectadas con respecto a aquellas sin infección en nuestros estudios de microambiente placentario murino. Estos resultados no son discordantes ya que nuestro modelo murino ha contemplado como variables la presencia de infección materna y el genotipo del parásito, pero no así la ocurrencia de infección congénita.

3. Genes candidatos para marcadores genéticos de Cardiopatía Chagásica Crónica

La enfermedad de Chagas se caracteriza por una fase aguda con manifestaciones clínicas de corta duración y otra fase, crónica, en la cual aproximadamente el 70% de los pacientes permanece sin sintomatología, y el 30% restante presenta alteraciones severas cardíacas, digestivas o ambas. Se han propuesto diferentes marcadores genéticos de

susceptibilidad a la CChC. Sin embargo, aún no se han encontrado aquellos que indiquen qué individuos desarrollarán la patología cardíaca (Dutra y col., 2005).

La mayoría de los estudios se han llevado a cabo con muestras sanguíneas de individuos de Perú, México, Colombia, Brasil y Bolivia (Vasconcelos y col., 2012), países donde el Chagas es endémico; pero hasta el momento no existían trabajos en poblaciones de nuestro país. Las diferencias observadas en los perfiles de susceptibilidad a la CChC encontrada en los trabajos mencionados podría deberse a las diferentes estructuras genéticas de las poblaciones estudiadas.

La estructura genética de una población está conformada por su historia evolutiva que abarca los eventos demográficos pasados y la co-evolución genética-cultural (Pritchard y col., 2000; Rosenberg y col., 2002; Laland y col., 2010). Los genes y la cultura evolucionan a ritmos diferentes y bajo diferentes reglas, pero al mismo tiempo están en una estrecha interacción. El equilibrio dinámico entre la antropología cultural y molecular resulta por demás interesante al considerarse la interacción hospedero-patógeno, como en el caso de la enfermedad de Chagas.

Un estudio sobre 283 momias humanas demuestra que el ciclo silvestre de transmisión de *T. cruzi* ya estaba establecido en el momento en que ocurrió la colonización humana de la costa andina (Aufderheide y col., 2004) y se sumaron a las muchas otras especies de mamíferos que actúan como hospederos reservorios de este parásito. Este hallazgo implica que *T. cruzi* y los seres humanos co-evolucionaron desde hace más de 9000 años. En este marco es probable que los amerindios del Sur hayan desarrollado una manera peculiar de hacer frente a la infección por *T. cruzi* que debe tenerse en cuenta en la epidemiología de la enfermedad de Chagas y estrategias de tratamiento (Sevini y col., 2013).

Siguiendo con esta línea, es de interés destacar que existen evidencias de una menor prevalencia de bloqueo de rama derecha en los individuos pertenecientes a la etnia *wichi* (1,8%) comparando con la población criolla (10%), siendo ésta una de las anomalías más observadas en los electrocardiogramas de los pacientes con CChC (Moretti y col., 2010).

Las quimioquinas se han asociado no sólo con el control inicial de la infección de *T. cruzi*, sino también con el mantenimiento de la inflamación crónica que resulta de la incapacidad del sistema inmune para eliminar al parásito (Nogueira y col., 2012). Tanto las quimioquinas como sus receptores están involucrados en la migración leucocitaria hacia el tejido provocando infiltrados inflamatorios que conllevan a daños en el tejido cardíaco. El receptor de quimioquinas CC 5 (CCR5) se encuentra involucrado en este proceso y ya ha sido asociado a la patogénesis de la CChC (de Oliveira y col., 2016).

Es por todo lo descripto anteriormente que los resultados obtenidos a partir de nuestro estudio de poblaciones argentinas que demostraron una ausencia de equilibrio de Hardy-Weinberg en la región del genoma donde se ubica el gen *CCR5*, son por demás interesantes ya que sugieren una clara distinción entre la etnia *wichi* de la caucásica y criolla. Más aún, estas diferencias podrían tener efectos en las distintas proporciones de CChC que se han observado en estas poblaciones.

En diferentes estudios, con pequeños tamaños poblacionales, se analizaron variantes comunes del gen *CCR5* de forma individual con resultados variables (Nogueira y col., 2012; Fernández-Mestre y col., 2004; Calzada y col., 2001). Sin embargo, debido a que diferentes polimorfismos en la región promotora pueden influenciar la expresión de dicho gen, los análisis para definir haplotipos resultan más convenientes (Flórez y col., 2012; Machuca y col., 2014). Más aún, el fuerte desequilibrio de ligamiento entre los *loci* genéticos para *CCR2* (receptor de quimioquina CC 2) y *CCR5*, debido a la presencia de un *cluster* génico (Barmania y Pepper, 2013), ha permitido el análisis combinado para definir haplotipos con fines de asociación de enfermedades.

Flórez y col. (2012) analizaron polimorfismos en la región promotora de *CCR5* en población colombiana y encontraron que el alelo G en **rs2856758** se asociaba con un riesgo reducido de susceptibilidad a desarrollar CChC y el alelo T en **rs2734648** con la gravedad de CChC. Sin embargo, en este trabajo no hallaron evidencia de asociación de las variantes **rs1799987** y **rs1799988** que fueron descritas por otros autores (Nogueira y col., 2012; Calzada y col., 2001). Este mismo grupo (Machuca y col., 2014), dos años después, demostró en un

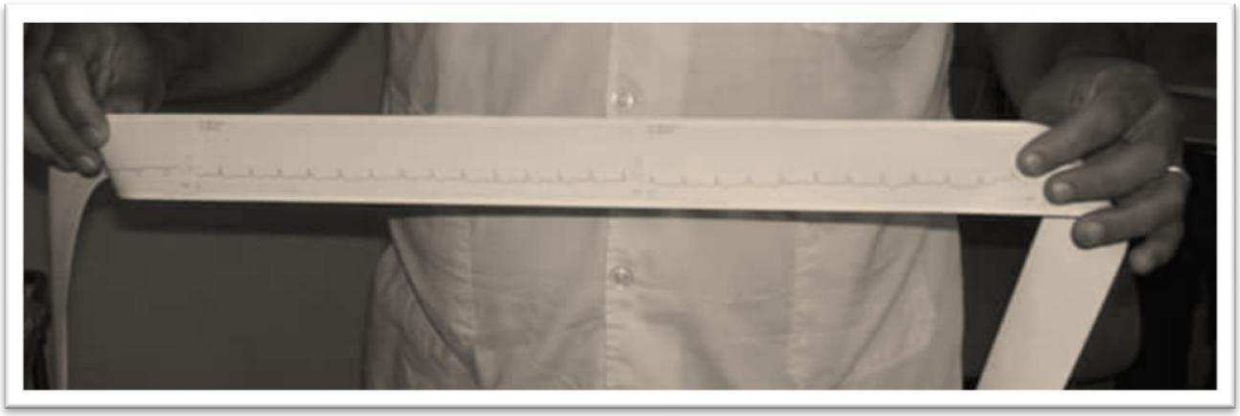
estudio de replicación en una cohorte independiente de mayor tamaño que el alelo T en la posición -1835 (**rs1800024**) en el promotor de *CCR5* correlacionaba con una mayor afección cardíaca. Aunque en ese estudio no lograron replicar los resultados para el polimorfismo funcional de *CCR5* (**rs2734648** o -2554), si se demostró una tendencia hacia la asociación del alelo T con formas menos graves de la CChC. Además, el resultado fue corroborado al analizar de forma combinada las dos poblaciones, mostrando un aumento de significación estadística, y reforzando así la importancia de este polimorfismo en la CChC. De la misma forma, en este último trabajo, el alelo G del SNP **rs1800023** o -2086 presentó una asociación con formas menos graves de la enfermedad, siendo más frecuente en pacientes con CChC leve o moderada y en el estudio combinado encontraron asociación con la protección. Estos resultados podrían ser correlacionados con el hallazgo de que los dos últimos alelos son parte de un haplotipo con una menor actividad transcripcional (Mamtani y col., 2011).

En cuanto a los efectos de estas mutaciones, estudios previos han demostrado que varios cambios polimórficos en el promotor pueden influir de manera diferente tanto en los niveles de expresión de *CCR5* de superficie como en las proporciones de células de sangre periférica que expresan esta proteína. Por ejemplo, la transversión G>T en la posición -2554 (**rs2734648**) ha sido asociada con diferencias en la unión de la familia NFkB de factores de transcripción (Mummidi y col., 2000); y en el caso de la posición -2132 (**rs41469351**) los alelos T y C se unen de forma diferente a los factores nucleares de la células T Jurkat (Mamtani y col., 2011).

En nuestro trabajo, hemos encontrado que en ambas poblaciones estudiadas, el alelo mutante T en **rs2734648** se asoció a mayor riesgo de desarrollar CChC bajo diferentes análisis. Además, el único SNP cuyas frecuencias alélicas y genotípicas -bajo un modelo de dominancia- resultaron diferentes en la población criolla/caucásica respecto a la *wichi* fue el **rs41469351**, monomórfico en esta última. Estos resultados reforzarían por un lado la asociación ya descripta para otras poblaciones entre el alelo T en **rs2734648** con la CChC y por otro lado sugieren que la población *wichi* podría presentar una prevalencia menor de CChC debido a ser monomórfica para **rs41469351.**

Sin embargo, la progresión de ciertos individuos a CChC es probablemente un proceso multifactorial. Por lo tanto, las asociaciones encontradas en este estudio deben tomarse sólo como uno de los factores de riesgo predisponentes a desarrollar la enfermedad y que estaría actuando en sinergia con otros factores.

CONCLUSIÓN



- La cepa VD de *T. cruzi*, aislada de un caso de infección congénita humana presenta un marcado tropismo placentario, contrariamente a la cepa K98.
- En el microambiente placentario murino, la infección con la cepa VD generó un aumento significativo en la transcripción de genes activados por IFN-γ.
- La infección por ambos genotipos de *T. cruzi*, K98 y VD, induce en el microambiente placentario una activación de vías relacionadas con el sistema inmunológico en detrimento de las vías de metabolismo celular y disminuye la expresión de genes relacionados con el gránulo secretorio, con implicancias en la modulación de la respuesta inmune.

- Las mutaciones en la región promotora del gen *MMP2* humano en los sitios **rs2285053** y **rs243866**, que disminuyen su actividad transcripcional, están asociadas con la susceptibilidad del feto a la infección congénita por *T. cruzi.*
- Los SNPs ubicados en regiones intrónicas del gen *ADAM12*, **rs11244787** y **rs1871054** también se encuentran asociados al riesgo de transmisión congénita.
- Los polimorfismos estudiados pertenecientes a los genes *ALPP* y *MMP9* no mostraron asociación con la transmisión vertical.
- La técnica de HRMA para SNPs de un único nucleótido y la electroforesis capilar para un *locus* de microsatélite resultan métodos de genotipificación adecuados de bajo costo y de simple aplicación.

- En la población *no wichi* una sola copia del alelo T del SNP **rs41469351** resultó ser factor de riesgo de CChC.
- El haplotipo GACA (**rs2734648**, **rs1799987**, **rs1799988** y **rs1800023**) estuvo más representado en individuos con patología demostrada en la población *wichi.*
- La replicación de estudios de asociación de SNPs en el gen *CCR5* con la CChC en población argentina mostraron la importancia de la mutación en el sitio **rs2734648** en la progresión a CChC.

PERSPECTIVAS

Nuevos estudios que profundicen en la caracterización de la respuesta generada por el hospedero, en especial en humanos, tanto a nivel genético como a nivel proteico, son necesarios para una mayor comprensión de los mecanismos que causan infección congénita de *T. cruzi*.

Las vías relacionadas a respuesta a IFN-γ y gránulo secretorio serán estudiadas en profundidad en modelo *ex vivo* de vellosidades coriónicas humanas infectadas con las cepas de *T. cruzi* utilizadas en este trabajo. Se analizará la expresión de genes humanos tales como *GZMH* (ortólogo a *Gzmd* y *Gzmg*), *GBP3*, *GBP4* (ortólogos a *Gbp2* y *Gbp3*, respectivamente), *SERPINA5*, *GBP6* e *IRG1*.

Es además de interés ampliar la investigación de mutaciones en genes que resulten marcadores genéticos de riesgo de infección congénita por *T. cruzi.* En esta dirección, se ha iniciado un estudio de campo que implica el reclutamiento prospectivo de binomios madre infectada-recién nacido para estudios comparativos de transcriptómica en placentas de casos congénitos y no congénitos y para ampliar el análisis de polimorfismos de SNPs en genes de expresión placentaria y validar los ya estudiados en muestras enmascaradas (Proyectos ERANET-LAC HID 328 y PICT V 2015).

Finalmente, en el último año hemos aumentado el tamaño de muestras de adultos provenientes de operativos en zonas endémicas y de hospitales de Buenos Aires para continuar con el trabajo de asociación de polimorfismos genéticos y la CChC. En este marco, se ha obtenido financiación del Programa Iberoamericano de Ciencia y Tecnología para el Desarrollo (P216RT0102, CYTED 2016), para la creación de la Red Iberoamericana de Medicina Genómica en Enfermedad de Chagas, formada por nueve grupos de investigación, que plantea crear una base de datos de individuos que contenga distintas variables de marcadores genéticos, utilizando la tecnología de chips de genotipado de genoma completo.

BIBLIOGRAFÍA

Aghababaei M, Beristain AG. *The Elsevier Trophoblast Research Award Lecture: Importance of metzincin proteases in trophoblast biology and placental development: a focus on ADAM13.* Placenta, 2015; 36 Suppl 1:S11-9.

Alarcón M, Pérez MC, Villarreal J, Araujo S, Goncalves L, González A, Moreno E, Lugo-Yarbuh A. *Detection of Trypanosoma cruzi DNA in the placentaand fetuses of mice with Chagasic acute infection.* Invest Clin, 2009; 50, 335–345.

Altemani M, Bittencourt L, Lana M. *Immunohistochemical characterization of the inflammatory infiltrate in placental Chagas' disease: a qualitative and quantitative analysis.* Am J Trop Med Hyg, 2000; 62(2), pp.319–24.

Albareda MC, Laucella SA, Alvarez MG, Armenti AH, Bertochi G, Tarleton RL, Postan M. *Trypanosoma cruzi modulates the profile of memory CD8+ T cells in chronic Chagas' disease patients.* Int Immunol, 2006; 18(3):465-71.

Albareda MC, Olivera GC, Laucella SA, Alvarez MG, Fernandez ER, Lococo B, Viotti R, Tarleton RL, Postan M. *Chronic human infection with Trypanosoma cruzi drives CD4+ T cells to immune senescence.* J Immunol, 2009; 183(6):4103-8.

Álvarez MG, Hernández Y, Bertocchi G, Fernández M, Lococo B, Ramírez JC, Cura C, Albizu CL, Schijman A, Abril M, Sosa-Estani S, Viotti R. *New Scheme ofIntermittent Benznidazole Administration in Patients Chronically Infected withTrypanosoma cruzi: a Pilot Short-Term Follow-Up Study with Adult Patients.* Antimicrob Agents Chemother, 2015; 60(2):833-7.

Andrade SG. *The influence of the strain of Trypanosoma cruzi in placental infections in mice.* Trans R Soc Trop Med Hyg, 1982; 76(1): 123-128.

Andrade SG. *Trypanosoma cruzi: clonal structure of parasite strains and the importance of principal clones.* Mem Inst Oswaldo Cruz, 1999; 94 Suppl 1: 185-187.

Araujo SE, Dumarco RB, Bocchini SF, Nahas SC, Kiss DR, Cecconello I. *Recurrence of chagasic megacolon after surgical treatment: clinical, radiological, and functional evaluation.* Clinics, 2007; 62(1): 89-93.

Atias A, Aguirre L, Campero E, Parrochia E, Jarpa S, Pizarro D, Silva M. *Megaesophagus and Chagas' disease: first cases described in Chile.* Bol Chil Parasitol, 1962; 17:20-3.

Aufderheide AC, Salo W, Madden M, Streitz J, Buikstra J. *A 9,000-year record of Chagas' disease.* Proc Natl Acad Sci U S A, 2004; 101(7): 2034–9.

Azogue E, La Fuente C, Darras C. *Congenital Chagas' disease in Bolivia: epidemiological aspects and pathological findings.* Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg, 1985; 79, 176–180.

Azogue E. *Women and congenital Chagas' disease in Santa Cruz, Bolivia: epidemiological and sociocultural aspects.* Soc. Sci. Med, 1993; 37, 503–511.

Barcán L, Luna C, Clara L, Sinagra A, Valledor A, De Rissio AM, Gadano A, García MM, de Santibañes E, Riarte A. *Transmission of T. cruzi infection via liver transplantation to a nonreactive recipient for Chagas' disease.* Liver Transpl, 2005; 11(9): 1112-1116.

Barmania F, Pepper MS. *C-C chemokine receptor type five (CCR5): an emerging target for the control of HIV infection*. Appl. Transl. Genomics, 2013; 2, 3–16.

Barrett JC, Fry B, Maller J, Daly MJ. *Haploview: analysis and visualization of LD and haplotype maps.* Bioinformatics, 2005; 21(2):263–265.

Basile L, Jansa JM, Carlier Y, Salamanca DD, Angheben A, Bartoloni A, Seixas J, Van Gool T, Canavate C, Flores-Chavez M, Jackson Y, Chiodini PL, Albajar-Vinas P. *Working Group on Chagas Disease, 2011. Chagas disease in Europeancountries: the challenge of a surveillance system.* Euro Surveill, 2011; 16, 19968.

Belaunzarán ML, Wainszelbaum MJ, Lammel EM, Gimenez G, Aloise MM, Florin-Christensen J, Isola EL. *Phospholipase A1 from Trypanosoma cruzi infective stages generates lipid messengers that activate host cell protein kinase c.* Parasitology, 2007; 134(Pt 4):491-503.

Bellazi L, Germond S, Dupont C, Brun-Heath I, Taillandier A, De Mazancourt P, Dieudonné MN, Mornet E. *A sequence variation in the promoter of the placentalalkaline phosphatase gene (ALPP) is associated with allele-specific expression inhuman term placenta.* Placenta, 2010; 31(9):764-9.

Belo VA, Luizon MR, Carneiro PC, Gomes VA, Lacchini R, Lanna CM, Souza-Costa DC, Tanus-Santos JE. *Effect of metabolic syndrome risk factors and MMP-2 genetic variations on circulating MMP-2 levels in childhood obesity*. Mol Biol Rep, 2013; 40(3):2697-704.

Benhamou S, Sarasin A. *ERCC2/XPD gene polymorphisms and cancer risk.* Mutagenesis, 2002; 17(6):463-9.

Benirschke K, Kaufmann P, Baergen R, 2006. *Pathology of the human placenta*, 5th ed. Springer Science+Business Media, New York.

Benjamin RJ, Stramer SL, Leiby DA, Dodd RY, Fearon M, Castro E. *Trypanosoma cruzi infection in North America and Spain: evidence in support of transfusion transmission.* Transfusion, 2012; 52(9):1913-21.

Bern C, Verastegui M, Gilman RH, Lafuente C, Galdos-Cardenas G, Calderon M, Pacori J, Del Carmen AM, Aparicio H, Brady MF, Ferrufino L, Angulo N, Marcus S, Sterling C, Maguire JH. *Congenital Trypanosoma cruzi transmission in Santa Cruz.* Bolivia. Clin. Infect. Dis, 2009; 49, 1667–1674.

Bisio M, Seidenstein ME, Burgos JM, Ballering G, Risso M, Pontoriero R, Moreau M, Altcheh J, Leguizamón MS, Freilij H, Marceillac M, Schijman AG. *Urbanization of congenital transmission of Trypanosoma cruzi: prospective polymerase chain reaction study in pregnancy.* Trans R Soc Trop Med Hyg, 2011; 105(10):543-9.

Bisio M, Altcheh J, Lattner J, Moscatelli G, Fink V, Burgos JM, Bournissen FG, Schijman AG, Freilij H. *Benznidazole treatment of chagasic encephalitis in pregnant woman with AIDS.* Emerg Infect Dis, 2013; 19(9):1490-2.

Bittencourt AL, Sadigursky M, Da Silva AA, Menezes CA, Marianetti MM, Guerra SC, Sherlock I. *Evaluation of Chagas' disease transmission through breast-feeding*. Mem Inst Oswaldo Cruz, 1988; 83(1): 37-39.

Bittencourt AL. *Possible risk factors for vertical transmission of Chagas' disease.* Rev Inst Med Trop Sao Paulo, 1992; 34(5): 403-408.

Blanchet D, Brenière SF, Schijman AG, Bisio M, Simon S, Véron V, Mayence C, Demar-Pierre M, Djossou F, Aznar C. *First report of a family outbreak of Chagas disease in French Guiana and posttreatment follow-up.* Infect Genet Evol, 2014; 28:245-50.

Blanco SB, Segura EL, Cura EN, Chuit R, Tulian L, Flores I, Garbarino G, Villalonga JF, Gurtler RE. *Congenital transmission of Trypanosoma cruzi: an operational outline for detecting and treating infected infants in north-western Argentina.* Trop Med Int Health, 2000; 5(4): 293-301.

Bonney KM, Engman DM. *Chagas Heart Disease Pathogenesis: One 280 mechanisms or Many?* Curr. Mol. Med, 2008; 8:510-18.

Brener Z, Costa CA, Chiari C. *Differences in the susceptibility of Trypanosoma cruzi strains to active chemotherapeutic agents*. Rev Inst Med Trop Sao Paulo, 1976; 18(6): 450- 455.

Brutus L, Castillo H, Bernal C, Salas NA, Schneider D, Santalla JA y Chippaux JP. *Detectable Trypanosoma cruzi parasitemia during pregnancy and delivery as a risk factor for congenital Chagas disease.* Am J Trop Med Hyg, 2010; 83(5): 1044-1047.

Bua J, Volta BJ, Velazquez EB, Ruiz AM, Rissio AM, Cardoni RL. *Vertical transmission of Trypanosoma cruzi infection: quantification of parasite burdenin mothers and their children by parasite DNA amplification.* Trans. R. Soc. Trop.Med. Hyg, 2012; 106, 623–628.

Buckner FS, Urbina JA. *Recent Developments in Sterol 14-demethylase Inhibitors for Chagas Disease.* Int J Parasitol Drugs Drug Resist, 2012; 2:236-242.

Burgos JM, Begher SB, Freitas JM, Bisio M, Duffy T, Altcheh J, Teijeiro R, Lopez Alcoba H, Deccarlini F, Freilij H, Levin MJ, Levalle J, Macedo AM, Schijman AG. *Molecular diagnosis and typing of Trypanosoma cruzi populations and lineages in cerebral Chagas disease in a patient with AIDS.* Am J Trop Med Hyg, 2005; 73(6): 1016- 1018.

Burgos JM, Altcheh J, Bisio M, Duffy T, Valadares HM, Seidenstein ME, Piccinali R, Freitas JM, Levin MJ, Macchi L, Macedo AM, Freilij H, Schijman AG. *Direct molecular profiling of minicircle signatures and lineages of Trypanosoma cruzi bloodstream populations causing congenital Chagas disease.* Int J Parasitol, 2007; 37(12): 1319-1327

Burgos JM, Diez M, Vigliano C, Bisio M, Risso M, Duffy T, Cura C, Brusses B, Favaloro L, Leguizamon MS, Lucero RH, Laguens R, Levin MJ, Favaloro R, Schijman AG. *Molecular identification of Trypanosoma cruzi discrete typing units in end-stage chronic Chagas heart disease and reactivation after heart transplantation.* Clin Infect Dis, 2010; 51(5): 485-495.

Calzada JE, Nieto A, Beraún Y, Martín J. *Chemokine receptor CCR5 polymorphisms and Chagas' disease cardiomyopathy.* Tissue Antigens, 2001; 58(3):154-8.

Carlier Y, Rivera MT, Truyens C. Puissant F, Milaire J. *Interactions between chronic murine Trypanosoma cruzi infection and pregnancy: fetal growth retardation*. Am. J. Trop. Med. Hyg, 1987; 37, 534–540.

Carlier Y y Truyens C. *Maternal-fetal transmission of Trypanosma cruzi, one hundred years of research*. Telleria J, Tibayrenc M, editors. American trypanosomiasis Chagas disease. UK, USA: Elsevier, 2010; p. 539-81

Carlier Y, Torrico F. *Congenital infection with Trypanosoma cruzi: from mechanisms of transmission to strategies for diagnosis and control.* Rev Soc Bras Med Trop, 2003; 36(6): 767-771.

Carlier Y, Torrico F, Sosa-Estani S, Russomando G, Luquetti A, Freilij H, Albajar Vinas P. *Congenital Chagas disease: recommendations for diagnosis, treatment and control of newborns, siblings and pregnant women.* PLoS Negl Trop Dis, 2011; 5(10): e1250.

Carlier Y, Truyens C, Deloron P, Peyron F. *Congenital parasitic infections: a review*. Acta Trop, 2012; 121(2):55-70.

Carlier Y, Truyens C. *Congenital Chagas disease as an ecological model of interactions between Trypanosoma cruzi parasites, pregnant women, placenta and fetuses.* Acta Trop, 2015; 51:103-15.

Cecere MC, Vazquez-Prokopec GM, Ceballos LA, Gurevitz JM, Zarate JE, Zaidenberg M, Kitron U, Gurtler RE. *Comparative trial of effectiveness of pyrethroid insecticides against peridomestic populations of Triatoma infestans in northwestern Argentina.* J Med Entomol, 2006; 43(5): 902-909.

Celentano AM, González Cappa SM. *Induction of macrophage activation and opsonizing antibodies by Trypanosoma cruzi subpopulations.* Parasite Immunol, 1992; 14(2):155-67.

Cencig S, Coltel N, Truyens C, Carlier Y. *Fertility, gestation outcome andparasite congenital transmissibility in mice infected with TcI, TcII and TcVI geno-types of Trypanosoma cruzi.* PLoS Negl. Trop. Dis, 2013; 7, e2271.

Centers for Disease Control and Prevention (CDC). *Congenital transmission of Chagas disease - Virginia, 2010.* MMWR Morb Mortal Wkly Rep, 2012; 61(26):477-9.

Chagas. *Nova tripanozomiase humana. Estudos sobre a morfolojía e o ciclo evolutivo de Schizotrypanum cruzi n. gen., n. sp., ajente etiolójico de nova entidade morbida do homen.* Mem Inst Oswaldo Cruz, 1909; 1: 159–218.

Chagas. *Tripanosomiase americana; forma aguda da molestia.* Mem Inst Oswaldo Cruz, 1916; 8(2): 37-60.

Chiari E, Dias JC, Lana M, Chiari CA. *Hemocultures for the parasitological diagnosis of human chronic Chagas' disease.* Rev Soc Bras Med Trop, 1989; 22(1): 19-23.

Coelho PS, Klein A, Talvani A, Coutinho SF, Takeuchi O, Akira S, Silva JS, Canizzaro H, Gazzinelli RT, Teixeira MM. *Glycosylphosphatidylinositol-anchored mucin-like glycoproteins isolated from Trypanosoma cruzi trypomastigotes induce in vivo leukocyte recruitment dependent on MCP-1 production by IFN-gamma-primed-macrophages.* J Leukoc Biol, 2002; 71(5):837-44.

Consenso de Enfermedad de Chagas-Mazza. Rev. argent. cardiol., Ciudad Autónoma de Buenos Aires, 2011; v. 79, n. 6, p. 544-564.

Corrales RM, Mora MC, Negrette OS, Diosque P, Lacunza D, Virreira M, Breniere SF, Basombrio MA. *Congenital Chagas disease involves Trypanosoma cruzi sub-lineage IId in the northwestern province of Salta, Argentina.* Infect. Genet. Evol, 2009; 9, 278–283.

Coura JR y Pinto Dias JC. *Epidemiology, control and surveillance of Chagas disease - 100 years after its discovery*. Mem Inst Oswaldo Cruz, 2009; 104: 31-40.

Cox B, Kotlyar M, Evangelou AI, Ignatchenko V, Ignatchenko A, Whiteley K, Jurisica I, Adamson SL, Rossant J, Kislinger T. *Comparative systems biology of human and mouse as a tool to guide the modeling of human placental pathology*. Mol Syst Biol, 2009; 5:279.

Criado L, Flórez O, Martín J, González CI. *Genetic polymorphisms in TNFA/TNFR2 genes and Chagas disease in a Colombian endemic population.* Cytokine, 2012; 57(3):398-401

Cuna WR, Choque AG, Passera R, Rodriguez C. *Pro-inflammatory cytokine production in chagasic mothers and their uninfected newborns.* J. Parasitol, 2009; 95,891–894.

Cunha-Neto E, Dzau VJ, Allen PD, Stamatiou D, Benvenutti L, Higuchi ML, Koyama NS, Silva JS, Kalil J, Liew CC. *Cardiac gene expression profiling provides evidence for cytokinopathy as a molecular mechanism in Chagas' disease cardiomyopathy.* Am J Pathol, 2005; 167(2):305-13.

Cunha-Neto E, Chevillard C. *Chagas Disease Cardiomyopathy: Immunopathology and Genetics.* Mediators of Inflammation, 2014; 2014:683230.

Cura CI, Lattes R, Nagel C, Gimenez MJ, Blanes M, Calabuig E, Iranzo A, Barcan LA, Anders M, Schijman AG. *Early molecular diagnosis of acute Chagas disease after transplantation with organs from Trypanosoma cruzi-infected donors*. Am J Transplant, 2013; 13(12):3253-61.

Cura CI, Duffy T, Lucero RH, Bisio M, Péneau J, Jimenez-Coello M, Calabuig E, Gimenez MJ, Valencia Ayala E, Kjos SA, Santalla J, Mahaney SM, Cayo NM, Nagel C, Barcán L, Málaga Machaca ES, Acosta Viana KY, Brutus L, Ocampo SB, Aznar C, Cuba Cuba CA, Gürtler RE, Ramsey JM, Ribeiro I, VandeBerg JL, Yadon ZE, Osuna A, Schijman AG. *Multiplex Real-Time PCR Assay Using TaqMan Probes for the Identification of Trypanosoma cruzi DTUs in Biological and Clinical Samples.* PLoS Negl Trop Dis, 2015; 9(5):e0003765.

Davila HO, Revelli SS, Moreno HS, Valenti JL, Musso OC, Poli HO, Morini JC, Bottasso OA. *Infection with Trypanosoma cruzi during pregnancy inrats and a decrease in chronic myocardial lesions in their infected offspring.* Am.J. Trop. Med. Hyg, 1994; 50, 506–511.

de Freitas VL, da Silva SC, Sartori AM, Bezerra RC, Westphalen EV, Molina TD, Teixeira AR, Ibrahim KY, Shikanai-Yasuda MA. *Real-time PCR in HIV/Trypanosoma cruzi coinfection with and without Chagas disease reactivation: association with HIV viral load and CD4 level.* PLoS Negl Trop Dis, 2011; 5(8): e1277.

de Oliveira AP, Ayo CM, Bestetti RB, Brandão de Mattos CC, Cavasini CE, de Mattos LC. *The role of CCR5 in Chagas disease - a systematic review*. Infect Genet Evol, 2016; 45:132-137.

del Puerto F, Sanchez Z, Nara E, Meza G, Paredes B, Ferreira E, Russomando G. *Trypanosoma cruzi lineages detected in congenitally infected infants and Triatoma infestans from the same disease-endemic region under entomologic surveillance in Paraguay.* Am. J. Trop. Med. Hyg, 2010; 82, 386–390.

Delgado MA y Santos-Buch CA. *Transplacental transmission and fetal parasitosis of Trypanosoma cruzi in outbred white Swiss mice.* Am. J. Trop. Med. Hyg, 1978; 27, 1108–1115.

Delgado-Vega AM, Anaya JM. *Meta-analysis of HLA-DRB1 polymorphism in Latin American patients with rheumatoid arthritis*. Autoimmun Rev, 2007; 6(6):402-8.

Demacq C, Vasconcellos VB, Marcaccini AM, Gerlach RF, Silva WA, Tanus-Santos JE. *Functional polymorphisms in the promoter of the matrix metalloproteinase-9 (MMP-9) gene are not linked with significant plasma MMP-9 variations in healthy subjects.* Clin Chem Lab Med, 2008; 46(1):57–63.

Di Noia JM, Buscaglia CA, De Marchi CR, Almeida IC, Frasch AC. *A Trypanosoma cruzi small surface molecule provides the first immunological evidence that Chagas' disease is due to a single parasite lineage.* J Exp Med, 2002; 195(4): 401-413.

Di Pentima MC, Edwards MS. *Enzyme-linked immunosorbent assay for IgA antibodies to Trypanosoma cruzi in congenital infection*. Am. J. Trop. Med. Hyg, 1999; 60, 211–214.

Dias JC. *The indeterminate form of human chronic Chagas' disease. A clinical epidemiological review.* Rev Soc Bras Med Trop, 1989; 22(3): 147-156.

Dias JC, Silveira AC, Schofield CJ. *The impact of Chagas disease control in Latin America: a review.* Mem Inst Oswaldo Cruz, 2002; 97(5): 603-613.

Diez M, Favaloro L, Bertolotti A, Burgos JM, Vigliano C, Lastra MP, Levin MJ, Arnedo A, Nagel C, Schijman AG y Favaloro RR. *Usefulness of PCR strategies for early diagnosis of Chagas' disease reactivation and treatment follow-up in heart transplantation.* Am J Transplant, 2007; 7(6): 1633-1640.

Distefano G, Caruso M, La Malfa S, Gentile A, Wu S-B. *High resolution melting analysis is a more sensitive and effective alternative to gel-based platforms in analysis of SSR--an example in citrus*. PLoS One, 2012; 7(8):e44203.

Dolcini GL, Solana ME, Andreani G, Celentano AM, Parodi LM, Donato AM, Elissondo N, González Cappa SM, Giavedoni LD, Martínez Peralta L. *Trypanosoma cruzi (Chagas' disease agent) reduces HIV-1 replication in human placenta.* Retrovirology, 2008; 5:53.

Duaso J, Rojo G, Cabrera G, Galanti N, Bosco C, Maya JD, Morello A, Kemmerling U. *Trypanosoma cruzi induces tissue disorganization and destruction of chorionic villi in an ex vivo infection model of human placenta.* Placenta, 2010; 31(8):705-11.

Duffy T, Cura CI, Ramirez JC, Abate T, Cayo NM, Parrado R, Bello ZD, Velazquez E, Muñoz-Calderon A, Juiz NA, Basile J, Garcia L, Riarte A, Nasser JR, Ocampo SB, Yadon ZE, Torrico F, de Noya BA, Ribeiro I, Schijman AG. *Analytical performance of a multiplex Real-Time PCR assay using TaqMan probes for quantification of Trypanosoma cruzi satellite DNA in blood samples*. PLoS Negl Trop Dis, 2013; 7(1):e2000.

Dutra WO, Rocha MOC, Teixeira MM. *The clinical immunology of human Chagas disease.* Trends Parasitol, 2005; 21(12):581-7.

Eloi-Santos SM, Novato-Silva E, Maselli VM, Gazzinelli G, Colley DG, Correa-Oliveira R. *Idiotypic sensitization in utero of children born to motherswith schistosomiasis or Chagas' disease.* J. Clin. Invest, 1989. 84, 1028–1031.

Estrada-Gutierrez G, Gomez-Lopez N, Zaga-Clavellina V, Giono-Cerezo S, Espejel-Nuñez A, Gonzalez-Jimenez MA, Espino y Sosa S, Olson DM, Vadillo-Ortega F. *Interaction between pathogenic bacteria and intrauterine leukocytes triggers alternative molecular signaling cascades leading to labor in women.* Infect Immun, 2010; 78(11):4792-9.

Fernandes CD, Murta SM, Cerávolo IP, Krug LP, Vidigal PG, Steindel M, Nardi N, Romanha AJ. *Characterization of Trypanosoma cruzi strains isolated from chronic chagasic patients, triatomines and opossums naturally infected from the State of Rio Grande do Sul, Brazil.* Mem Inst Oswaldo Cruz, 1997; 92(3):343-51.

Fernandez-Aguilar S, Lambot MA, Torrico F, Alonso-Vega C, Córdoba, M, Suarez E, Noël JC, Carlier Y. *Placental lesions in human Trypanosoma cruzi infection.* Rev. Soc. Bras. Med. Trop, 2005; 38 (Suppl 2:), 84–86.

Fernández-Mestre MT, Montagnani S, Layrisse Z. *Is the CCR5-59029-G/G genotype a protective factor for cardiomyopathy in Chagas disease?* Hum Immunol, 2004; 65(7):725-8.

Fernández-Villegas A, Thomas MC, Carrilero B, Téllez C, Marañón C, Murcia L, Moralo S, Alonso C, Segovia M, López MC. *The innate immune response status correlates with a divergent clinical course in congenital Chagas disease of twins born in a non-endemic country.* Acta Trop, 2014; 140, 84–90.

Fiotti N, Moretti ME, Bussani R, Altamura N, Zamolo F, Gerloni R, Ukovich L, Ober E, Silvestri F, Grassi G, Adovasio R, Giansante C. *Features of vulnerable plaques and clinical outcome of UA/NSTEMI: Relationship with matrix metalloproteinase functional polymorphisms.* Atherosclerosis, 2011; 215(1):153-9.

Fishman WH. *Activation of developmental genes in neoplastic transformation.* Cancer Res, 1976; 36(9 PT 2):3423-8.

Flórez O, Zafra G, Morillo C, Martín J, González CI. *Interleukin-1 gene cluster polymorphism in chagas disease in a Colombian case-control study.* Hum Immunol, 2006; 67(9):741-8.

Flórez O, Martín J, González CI. *Genetic variants in the chemokines and chemokine receptors in Chagas disease.* Hum Immunol, 2012; 73(8):852-8.

Frayling TM. *Genome-wide association studies provide new insights into type 2 diabetes aetiology.* Nature Rev. Genet, 2007; 8, 657–663.

Freilij H, Muller L, Gonzalez Cappa SM. *Direct micromethod for diagnosis of acute and congenital Chagas' disease.* J Clin Microbiol, 1983; 18(2): 327-330.

Freilij H, Altcheh J. *Congenital Chagas' disease: diagnostic and clinical aspects.* Clin Infect Dis, 1995; 21(3): 551-555.

Fretes RE (a), de Fabro SP. *Human chagasic placental localization of enzymes associated to syncytiotrophoblast membrane*. Comun Biol, 1990; pp. 51–59

Fretes RE (b), de Fabro SP. *Trypanosoma cruzi: modification of alkaline phosphatase activity induced by trypomastigotes in cultured human placental villi.* Rev Inst Med Trop Sao Paulo, 1990; 32(6):403-8.

García MM, De Rissio AM, Villalonga X, Mengoni E, Cardoni RL. *Soluble tumor necrosis factor (TNF) receptors (sTNF-R1 and -R2) in pregnant womenchronically infected with Trypanosoma cruzi and their children.* Am. J. Trop. Med.Hyg, 2008; 78, 499–503.

Gascon J, Bern C, Pinazo MJ. *Chagas disease in Spain, the United States and other non-endemic countries.* Acta Trop, 2010; 115(1-2): 22-27.

Geurts N, Opdenakker G, Van den Steen PE. *Matrix metalloproteinases as therapeutic targets in protozoan parasitic infections.* Pharmacology & therapeutics, 2012; p. 257–79.

Gonzalez Cappa SM, Mirkin GA, Solana ME, Tekiel VS. *Trypanosoma cruzipathology. Strain dependent?* Medicina (B Aires), 1999; 59 (Suppl 2), 69–74.

Grill S, Rusterholz C, Zanetti-Dällenbach R, Tercanli S, Holzgreve W, Hahn S, Lapaire O. *Potential markers of preeclampsia--a review*. Reprod Biol Endocrinol, 2009; 7:70.

Gupta S, Bhatia V, Wen J, Wu Y, Huang YW, Huang MH and Garg NJ. *Trypanosoma cruzi infection disturbs mithocondrial membrane potential and ROS produccion rate in cardiomyocytes.* Free Radical Biol. & med., 2009; 1414:1421

Gürtler RE, Segura EL, Cohen JE. *Congenital transmission of Trypanosoma cruzi infection in Argentina.* Emerg Infect Dis, 2003; 9(1): 29-33.

Gürtler RE, Kitron U, Cecere MC, Segura EL, Cohen JE. *Sustainable vector control and management of Chagas disease in the Gran Chaco, Argentina.* Proc Natl Acad Sci U S A, 2007; 104(41):16194-9.

Gutierrez FR, Lalu MM, Mariano FS, Milanezi CM, Cena J, Gerlach RF, Santos JE, Torres-Dueñas D, Cunha FQ, Schulz R, Silva JS. *Increased activities of cardiac matrix metalloproteinases matrix metalloproteinase (MMP)-2 and MMP-9 are associated with mortality during the acute phase of experimental Trypanosoma cruzi infection.* J Infect Dis, 2008; 197(10):1468-76.

Hahn LW, Ritchie MD, Moore JH. *Multifactor dimensionality reduction software for detecting gene-gene and gene-environment interactions*. Bioinformatics, 2003; 19:376–83.

Hall BS, Pereira M. *Dual role for transforming growth factor beta-dependent signaling in Trypanosoma cruzi infection of mammalian cells*. Infect Immun, 2000; 68(4):2077–81.

Harendza S, Lovett DH, Panzer U, Lukacs Z, Kuhnl P, Stahl RA. *Linked common polymorphisms in the gelatinase a promoter are associated with diminished transcriptional response to estrogen and genetic fitness.* J Biol Chem, 2003; 278(23):20490-9.

Harold D, Jehu L, Turic D, Hollingworth P, Moore P, Summerhayes P, Moskvina V, Foy C, Archer N, Hamilton BA, Lovestone S, Powell J, Brayne C, Rubinsztein DC, Jones L, O'Donovan MC, Owen MJ, Williams J. *Interaction between the ADAM12 and SH3MD1 genes may confer susceptibility to late-onset Alzheimer's disease.* Am J Med Genet B Neuropsychiatr Genet, 2007; 144B(4):448-53.

Hermann E, Truyens C, Alonso-Vega C, Even J, Rodriguez P, Berthe A, Gonzalez-Merino E, Torrico F, Carlier Y. *Human fetuses are able to mount an adult like CD8 T-cell response.* Blood, 2002; 100, 2153–2158.

Hermann E, Truyens C, Alonso-Vega C, Rodriguez P, Berthe A, Torrico F, Carlier Y. *Congenital transmission of Trypanosoma cruzi is associated with maternal enhanced parasitemia and decreased production of interferon- gamma in response to parasite antigens*. J Infect Dis, 2004 189(7): 1274-1281.

Hermann E, Alonso-Vega C, Berthe A, Truyens C, Flores A, Cordova M, Moretta L, Torrico F, Braud V, Carlier Y. *Human congenital infection with Trypanosoma cruzi induces phenotypic and functional modifications of cord blood NK cells.* Pediatr, 2006; Res. 60, 38–43.

Higuchi ML, Fukasawa S, De Brito T, Parzianello LC, Bellotti G, Ramires JA. *Different microcirculatory and interstitial matrix patterns in idiopathic dilated cardiomyopathy and Chagas' disease: a three dimensional confocal microscopy study.* Heart, 1999; 82(3):279-85.

Hirakawa S, Lange E, Colicigno C, Freedman B, Rich S, Bowden D. *Evaluation of genetic variation and association in the matrix metalloproteinase 9 (MMP9) gene in ESRD patients.* Am J Kidney Dis, 2003; 42((1)):133-143.

Holmgren PA, Stigbrand T. *Purification and parital characterization of two genetic variants of placental alkaline phosphatase*. Biochem Genet, 1976; 14(9-10):777-89.

Howard EJ, Xiong X, Carlier Y, Sosa-Estani S, Buekens P. *Frequency of thecongenital transmission of Trypanosoma cruzi: a systematic review and meta-analysis*. Br. J. Obstet. Gynaecol, 2014; 121: 22–33.

Hua Y (a), Song L, Wu N, Xie G, Lu X, Fan X, Meng X, Gu D, Yang Y. *Polymorphisms of MMP-2 gene are associated with systolic heart failure prognosis.* Clin Chim Acta, 2009; 404(2):119-23.

Hua Y (b), Song L, Wu N, Lu X, Meng X, Gu D, Yang Y. *Polymorphisms of MMP-2 gene are associated with systolic heart failure risk in Han Chinese.* Am J Med Sci, 2009; 337(5):344-8.

Huang TS, Lee CC, Chang AC, Lin S, Chao CC, Jou YS, Chu YW, Wu CW, Whang-Peng J. *Shortening of microsatellite deoxy(CA) repeats involved in GL331-induced down-regulation of matrix metalloproteinase-9 gene expression.* Biochem Biophys Res Commun, 2003; 300(4):901-7.

Huizinga TW, Pisetsky DS, Kimberly RP. *Associations, populations, and the truth: recommendations for genetic association studies in Arthritis & Rheumatism.* Arthritis Rheum, 2004; 50(7):2066-71.

Id Boufker H, Alexandre H, Carlier Y, Truyens C. *Infertility in murine acuteTrypanosoma cruzi infection is associated with inhibition of pre-implantation embryo development*. Am. J. Pathol, 2006; 169, 1730–1738.

Imai K, Maeda T, Sayama Y, Mikita K, Fujikura Y, Misawa K, Nagumo M, Iwata O, Ono T, Kurane I, Miyahira Y, Kawana A, Miura S. *Mother-to-child transmission of congenital Chagas disease, Japan.* Emerg. Infect, 2014; 20,146–148.

Iniesta R, Guinó E, Moreno V. *Statistical analysis of genetic polymorphisms in epidemiological studies*. Gac Sanit, 2005; 19(4):333-41.

International Multiple Sclerosis Genetics Consortium, Hafler DA, Compston A, Sawcer S, Lander ES, Daly MJ, De Jager PL, de Bakker PI, Gabriel SB, Mirel DB, Ivinson AJ, Pericak-Vance MA, Gregory SG, Rioux JD, McCauley JL, Haines JL, Barcellos LF, Cree B, Oksenberg JR, Hauser SL. *Risk alleles for multiple sclerosis identified by a genomewide study.* N Engl J Med, 2007; 357(9):851-63.

John S, Shephard N, Liu G, Zeggini E, Cao M, Chen W, Vasavda N, Mills T, Barton A, Hinks A, Eyre S, Jones KW, Ollier W, Silman A, Gibson N, Worthington J, Kennedy GC. *Whole-genome scan, in a complex disease, using 11,245 single-nucleotide polymorphisms: comparison with microsatellites.* Am J Hum Genet, 2004; 75(1):54-64.

Kabat AM, Srinivasan N, Maloy KJ, 2014. *Modulation of immune development and function by intestinal microbiota.* Trends Immunol, 2014; 35, 507–517.

Kemmerling U, Bosco C, Galanti N. *Infection and invasion mechanisms of Trypanosoma cruzi in the congenital transmission of Chagas' disease: a proposal.* Biol Res, 2010; 43(3):307-16.

Khatri P, Sirota M, Butte AJ. Ten *Years of Pathway Analysis: Current Approaches and Outstanding Challenges*. Ouzounis CA, ed. PLoS Computational Biology, 2012; 8(2):e1002375.

Khusal KG, Tonelli RR, Mattos EC, Soares CO, Di Genova BM, Juliano MA, Urias U, Colli W, Alves MJ. *Prokineticin receptor identified by phage display is an entry receptor for Trypanosoma cruzi into mammalian cells.* Parasitol Res, 2015; 114(1):155-65.

Koga K, Izumi G, Mor G, Fujii T, Osuga Y. *Toll-like receptors at the maternal–fetal interface in normal pregnancy and pregnancy complications.* Am. J. Reprod. Immunol, 2014; 72, 192–205.

Korkmaz KS, de Rooij BJ, van Hoek B, Janse M, Coenraad MJ, van der Reijden JJ, Weersma RK, Porte RJ, Voorneveld PW, Baranski AG, Verspaget HW. *MMP-2 is a disease-modifying gene in primary sclerosing cholangitis.* Liver Int, 2014; 34(2):274-80.

Kveiborg M, Albrechtsen R, Couchman JR, Wewer UM. *Cellular roles of ADAM12 in health and disease.* Int J Biochem Cell Biol, 2008; 40(9):1685-703.

La Flamme AC, Kahn SJ, Rudensky AY, Van Voorhis WC. *Trypanosoma cruzi-infected macrophages are defective in major histocompatibility complex class II antigen presentation.* Eur J Immunol, 1997; 27(12):3085-94.

Laland KN, Odling-Smee J, Myles S. *How culture shaped the human genome: bringing genetics and the human sciences together.* Nat Rev Genet, 2010; 11(2): 137–48.

Laumet G, Petitprez V, Sillaire A, Ayral AM, Hansmannel F, Chapuis J, Hannequin D, Pasquier F, Scarpini E, Galimberti D, Lendon C, Campion D, Amouyel P, Lambert JC. *A study of the association between the ADAM12 and SH3PXD2A (SH3MD1) genes and Alzheimer's disease*. Neurosci Lett, 2010; 468(1):1-3.

Lee TY, Yu CC, Wu CC, Chang CS, Lin JT, Wu MS, Chen HP, Wu CY. *MMP-9 -1562 Promoter Polymorphism Associated with Gastric Cancer Risk in Females.* Hepatogastroenterology, 2013; 60(126).

Leitner K, Szlauer R, Ellinger I, Ellinger A, Zimmer KP, Fuchs R. *Placental alkaline phosphatase expression at the apical and basal plasma membrane in term villous trophoblasts*. J Histochem Cytochem, 2001; 49(9):1155-64.

Lescure FX, Le Loup G, Freilij H, Develoux M, Paris L, Brutus L, Pialoux G. *Chagas disease: changes in knowledge and management.* Lancet Infect Dis, 2010; 10(8): 556-570.

Llewellyn MS, Messenger LA, Luquetti AO, Garcia L, Torrico F, Tavares SB, Cheaib B, Derome N, Delepine M, Baulard C, Deleuze JF, Sauer S, Miles MA. *Deep sequencing of the Trypanosoma cruzi GP63 surface proteases reveals diversity and diversifying selection among chronic and congenital Chagas disease patients.* PLoS Negl. Trop. Dis, 2015; 9, e0003458.

Locksmith GJ, Clark P, Duff P, Schultz GS. *Amniotic fluid matrix metalloproteinase-9 levels in women with preterm labor and suspected intra-amniotic infection*. Obstet Gynecol, 1999; 94(1):1-6.

Lucarelli P, Scacchi R, Corbo RM, Benincasa A, Palmarino R. *Human placental alkaline phosphatase electrophoretic alleles: quantitative studies.* Am J Hum Genet, 1982; 34(2):331-6.

Luquetti AO, Miles MA, Rassi A, de Rezende JM, de Souza AA, Povoa MM, Rodrigues I. *Trypanosoma cruzi: zymodemes associated with acute and chronic Chagas' disease in central Brazil*. Trans R Soc Trop Med Hyg, 1986; 80(3): 462-470.

Macedo AM, Pena SD. *Genetic Variability of Trypanosoma cruzi: Implications for the Pathogenesis of Chagas Disease.* Parasitol Today, 1998; 14(3): 119-124.

Macedo AM, Machado CR, Oliveira RP, Pena SD. *Trypanosoma cruzi: genetic structure of populations and relevance of genetic variability to the pathogenesis of chagas disease.* Mem Inst Oswaldo Cruz, 2004; 99(1): 1-13.

Machado FS, Jelicks LA, Kirchhoff LV, Shirani J, Nagajyothi F, Mukherjee S, Nelson R, Coyle CM, Spray DC, de Carvalho AC, Guan F, Prado CM, Lisanti MP, Weiss LM, Montgomery SP, Tanowitz HB. *Chagas heart disease: report on recent developments*. Cardiol Rev, 2012; 20(2):53-65.

Machuca MA, Suárez EU, Echeverría LE, Martín J, González CI. *SNP/haplotype associations of CCR2 and CCR5 genes with severity of chagasic cardiomyopathy*. Hum Immunol, 2014; 75(12):1210-5.

Maeda FY, Cortez C, Yoshida N. *Cell signaling during Trypanosoma cruzi invasion.* Frontiers in Immunology. 2012; 3:361.

Mamtani M, Mummidi S, Ramsuran V, Pham MH, Maldonado R, Begum K, Valera MS, Sanchez R, Castiblanco J, Kulkarni H, Ndung'u T, He W, Anaya JM, Ahuja SK. *Influence of variations in CCL3L1 and CCR5 on tuberculosis in a northwestern Colombian population.* J Infect Dis, 2011; 203(11):1590-4.

Marcili A, Lima L, Cavazzana M, Junqueira AC, Veludo HH, Maia Da Silva F, Campaner M, Paiva F, Nunes VL, Teixeira MM. *A new genotype of Trypanosoma cruzi associated with bats evidenced by phylogenetic analyses using SSU rDNA, cytochrome b and Histone H2B genes and genotyping based on ITS1 rDNA.* Parasitology, 2009; 136(6):641-55.

Marian AJ. *Molecular genetic studies of complex phenotypes*. Transl Res, 2012; 159(2):64-79.

Marin-Neto JA, Cunha-Neto E, Maciel BC, Simões M V. *Pathogenesis of chronic Chagas heart disease.* Circulation, 2007; 115(9):1109-23.

Marino AP, Silva AA, Santos PV, Pinto LM, Gazinelli RT, Teixeira MM, Lannes-Vieira J. *CC-chemokine receptors: a potential therapeutic target for Trypanosoma cruzi elicited myocarditis.* Mem Inst Oswaldo Cruz, 2005; 100 Suppl 1:93-6..

Mayer JP, Biancardi M, Altcheh J, Freilij H, Weinke T, Liesenfeld O. *Congenital infections with Trypanosoma cruzi or Toxoplasma gondii are associated with decreased serum concentrations of*

interferon-gamma and interleukin-18 but increased concentrations of interleukin-10. Ann. Trop. Med. Parasitol, 2010; 104,485–493.

Medeiros GA, Silvério JC, Marino AP, Roffê E, Vieira V, Kroll-Palhares K, Carvalho CE, Silva AA, Teixeira MM, Lannes-Vieira J. *Treatment of chronically Trypanosoma cruzi-infected mice with a CCR1/CCR5 antagonist (Met-RANTES) results in amelioration of cardiac tissue damage.* Microbes Infect, 2009; 11(2):264-73.

Medina-Lopes, MD, Macêdo V. *Trypanosoma cruzi no colostro humano.* Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical, 1983; 16(3), 170.

Menezes CA, Bitterncourt AL, Mota E, Sherlock I, Ferreira J. *The assessment of parasitemia in women who are carriers of Trypanosoma cruzi infection during and after pregnancy.* Rev Soc Bras Med Trop, 1992; 25(2): 109- 113.

Metzger IF, Luizon MR, Lacchini R, Tanus-Santos JE. *Genetic variants in matrix metalloproteinase-9 gene modify metalloproteinase-9 levels in black subjects.* DNA Cell Biol, 2012; 31(4):504–10.

Mezzano L, Sartori MJ, Lin S, Repossi G, de Fabro SP. *Placental alkaline phosphatase (PLAP) study in diabetic human placental villi infected with Trypanosoma cruzi.* Placenta, 2005; 26(1), 85–93.

Miles MA, Souza A, Povoa M, Shaw JJ, Lainson R y Toye PJ. *Isozymic heterogeneity of Trypanosoma cruzi in the first autochthonous patients with Chagas' disease in Amazonian Brazil.* Nature, 1978; 272(5656): 819-821.

Ming M, Ewen ME, Pereira ME. *Trypanosome invasion of mammalian cells requires activation of the TGF beta signaling pathway*. Cell, 1995; 82(2):287–96.

Mirkin GA, Celentano AM, Malchiodi EL, Jones M, González Cappa SM. *Different Trypanosoma cruzi strains promote neuromyopathic damage mediated by distinct T lymphocyte subsets.* Clin Exp Immunol, 1997; 107(2):328-34.

Mjihdi A, Lambot MA, Stewart IJ, Detournay O, Noel JC, Carlier Y, Truyens C. *Acute Trypanosoma cruzi infection in mouse induces infertility or placental parasite invasion and ischemic necrosis associated with massive fetal loss.* Am.J. Pathol, 2002; 161, 673–680.

Molina I, Gómez i Prat J, Salvador F, Treviño B, Sulleiro E, Serre N, Pou D, Roure S, Cabezos J, Valerio L, Blanco-Grau A, Sánchez-Montalvá A, Vidal X, Pahissa A. Randomized trial of posaconazole and benznidazole for chronic Chagas' disease. N Engl J Med, 2014; 370(20):1899-908.

Mootha VK, Lindgren CM, Eriksson KF, Subramanian A, Sihag S, Lehar J, Puigserver P, Carlsson E, Ridderstråle M, Laurila E, Houstis N, Daly MJ, Patterson N, Mesirov JP, Golub TR, Tamayo P, Spiegelman B, Lander ES, Hirschhorn JN, Altshuler D, Groop LC. *PGC-1alpha-responsive genes involved in oxidative phosphorylation are coordinately downregulated in human diabetes.* Nat Genet, 2003; 34(3):267-73.

Moreno EA, Rivera IM, Moreno SC, Alarcon ME, Lugo-Yarbuh A. *Vertical transmission of Trypanosoma cruzi in Wistar rats during the acute phase of infection.* Invest. Clin, 2003; 44, 241–254.

Moretti E, Basso B, Castro I, Carrizo Paez M, Chaul M, Barbieri G, Canal Feijoo D, Sartori MJ, Carrizo Paez R. *Chagas' disease: study of congenital transmission in cases of acute maternal infection.* Rev Soc Bras Med Trop, 2005; 38(1): 53-55.

Moretti E, Castro I, Franceschi C, Basso B. *Chagas disease: serological and electrocardiographic studies in Wichi and Creole communities of Misión Nueva Pompeya, Chaco, Argentina.* Mem Inst Oswaldo Cruz, 2010; 105(5):621-7.

Morgan AR, Han DY, Thompson JM, Mitchell E, Ferguson LR. *Analysis of MMP2 promoter polymorphisms in childhood obesity. BMC Res Notes*. BioMed Central Ltd, 2011; 4(1):253.

Morillo CA, Marin-Neto JA, Avezum A, Sosa-Estani S, Rassi A Jr, Rosas F, Villena E, Quiroz R, Bonilla R, Britto C, Guhl F, Velazquez E, Bonilla L, Meeks B, Rao-Melacini P, Pogue J, Mattos A, Lazdins J, Rassi A, Connolly SJ, Yusuf S; BENEFIT Investigators. *Randomized Trial of Benznidazole for Chronic Chagas' Cardiomyopathy.* N Engl J Med, 2015; 373(14):1295-306.

Mortara RA, Andreoli WK, Taniwaki NN, Fernandes AB, Silva CV, Fernandes MC, L'Abbate C y Silva S. *Mammalian cell invasion and intracellular trafficking by Trypanosoma cruzi infective forms.* An Acad Bras Cienc, 2005; 77(1): 77-94.

Moya PR, Villagra L, Risco J. *Congenital Chagas disease: anatomopatholog-ical findings in the placenta and umbilical cord.* Rev. Fac. Cienc. Med, 1979; 37, 21–27.

Muller LA, Añasco N, González Cappa SM. *Trypanosoma cruzi: isolate dependence in the induction of lytic antibodies in the mouse and rabbit.* Exp Parasitol, 1986; 61(3):284-93.

Muller LA, González Cappa SM. *Immunogenicity of Trypanosoma cruzi strains determined by neutralization test.* Rev Argent Microbiol, 1987; 19(3):101-7.

Mummidi S, Bamshad M, Ahuja SS, Gonzalez E, Feuillet PM, Begum K, Galvis MC, Kostecki V, Valente AJ, Murthy KK, Haro L, Dolan MJ, Allan JS, Ahuja SK. Evolution of human and non-human primate CC chemokine receptor 5 gene and mRNA. *Potential roles for haplotype and mRNA diversity, differential haplotype-specific transcriptional activity, and altered transcription factor binding to polymorphic nucleotides in the pathogenesis of HIV-1 and simian immunodeficiency virus.* J Biol Chem, 2000; 275(25):18946-61.

Muñoz S, Lorca M, Munoz P, Solari A. *Highly homogeneous Trypanosoma cruzi populations in a low endemic region for Chagas disease: importance in the pathogenesis of Chagas disease in Chile*. Rev Med Chil, 1994; 122(11): 1231-1238.

Murta SM, Romanha AJ. *In vivo selection of a population of Trypanosoma cruzi and clones resistant to benznidazole.* Parasitology, 1998; 116 (Pt2): 165-171.

Nanaev AK, Kosanke G, Kemp B, Frank HG, Huppertz B, Kaufmann P.*The human placenta is encircled by a ring of smooth muscle cells*. Placenta, 2000; 21,122–125.

Neves SF, Eloi-Santos S, Ramos R, Rigueirinho S, Gazzinelli G, Correa-Oliveira R. *In utero sensitization in Chagas' disease leads to altered lymphocyte phenotypic patterns in the newborn cord blood mononuclear cells.* Parasite Immunol, 1999; 21, 631–639.

Nicklas JA., Noreault-Conti T, Buel E. *Development of a Fast, Simple Profiling Method for Sample Screening Using High Resolution Melting (HRM) of STRs*. J Forensic Sci, 2012; 57(2):478–88.

Nogueira LG, Santos RH, Ianni BM, Fiorelli AI, Mairena EC, Benvenuti LA, Frade A, Donadi E, Dias F, Saba B, Wang HT, Fragata A, Sampaio M, Hirata MH, Buck P, Mady C, Bocchi EA, Stolf NA, Kalil J, Cunha-Neto E. *Myocardial chemokine expression and intensity of myocarditis in Chagas cardiomyopathy are controlled by polymorphisms in CXCL9 and CXCL10*. PLoS Negl Trop Dis, 2012; 6(10):e1867.

Norman FF, López-Vélez R. *Chagas disease and breast-feeding*. Emerg Infect Dis, 2013; 19(10):1561-6.

Noya BA, Díaz-Bello Z, Colmenares C, Ruiz-Guevara R, Mauriello L, Muñoz-Calderón A, Noya O. *Update on oral Chagas disease outbreaks in Venezuela: epidemiological, clinical and diagnostic approaches*. Mem Inst Oswaldo Cruz. 2015 May;110(3):377-86.

OMS. *Model Prescribing Information: Drugs used in parasitic diseases.* World Health Organization, *Geneva*, 1995.

OMS. *Control of Chagas disease. Second Report of the WHO Expert Committe. WHO TRS905.* World Health Organization, Ginebra, Suiza, 2003.

OMS. *Scientific working group: report on Chagas Disease [Reporte del grupo de trabajo científico sobre la enfermedad de Chagas].* World Health Organization, Geneva, 2007.

OMS. *Chagas disease in Latin America: an epidemiological update based on 2010 estimates.* World Health Organization, 2015. Wkly Epidemiol Rec. 2015; 90(6):33-43.

Ortak H, Demir S, Ateş O, Söğüt E, Alim S, Benli I. *Association of MMP2-1306C/T and TIMP2G-418C polymorphisms in retinal vein occlusion.* Exp Eye Res, 2013; 113:151-5.

Ortiz S, Zulantay I, Solari A, Bisio M, Schijman A, Carlier Y, Apt W. *Presence of Trypanosoma cruzi in pregnant women and typing of lineages incongenital cases.* Acta Tro, 2012; 124, 243–246.

Ouaissi MA, Afchain D, Capron A, Grimaud JA. *Fibronectin receptors on Trypanosoma cruzi trypomastigotes and their biological function.* Nature, 1984; 308(5957):380-3.

Ouaissi MA, Cornette J, Capron A. *Identification and isolation of Trypanosoma cruzi trypomastigote cell surface protein with properties expected of a fibronectin receptor.* Mol Biochem Parasitol, 1986; 19(3):201-11.

Pereira JB, Wilcox HP, Coura JR. *The evolution of chronic chagasic cardiopathy. The influence of parasitemia*. Rev Soc Bras Med Trop, 1992; 25(2): 101-108.

Petersen CA, Krumholz KA, Carmen J, Sinai AP, Burleigh BA. *Trypanosoma cruzi infection and nuclear factor kappa B activation prevent apoptosis in cardiac cells*. Infect Immun, 2006; 74(3):1580-7.

Picollo MI, Vassena C, Santo Orihuela P, Barrios S, Zaidemberg M, Zerba E. *High resistance to pyrethroid insecticides associated with ineffective field treatments in Triatoma infestans (Hemiptera: Reduviidae) from Northern Argentina*. J Med Entomol, 2005; 42(4): 637-643.

Pifano FC. *El diagnóstico parasitológico de la enfermedad de Chagas en fase crónica. Estudio comparativo entre la gota gruesa, el xenodiagnóstico, el hemocultivo y las inoculaciones experimentales en animales sensibles.* Archivos Venezolanos de Patología Tropical, 1954; 2: 89-120.

Pinto CM, Kalko EK, Cottontail I, Wellinghausen N, Cottontail VM (). *TcBat a bat-exclusive lineage of Trypanosoma cruzi in the Panama Canal Zone, with comments on its classification and the use of the 18S rRNA gene for lineage identification.* Infect Genet Evol, 2012; 12(6): 1328-1332.

Platt JS, Hunt JS. *Interferon-gamma gene expression in cycling and pregnant mouse uterus: temporal aspects and cellular localization.* J Leukoc Biol, 1998; 64(3):393-400.

Pollheimer J, Fock V, Knöfler M. Review: *The ADAM metalloproteinases - Novel regulators of trophoblast invasion?* Placenta, 2014; 35(SUPPL):57-63.

Portela-Lindoso AA, Shikanai-Yasuda MA. *Chronic Chagas' disease: from xenodiagnosis and hemoculture to polymerase chain reaction*. Rev Saude Publica, 2003; 37(1): 107-115.

Price SJ, Greaves DR, Watkins H. *Identification of novel, functional genetic variants in the human matrix metalloproteinase-2 gene: role of Sp1 in allele-specific transcriptional regulation.* J Biol Chem, 2001; 276(10):7549-58.

Pritchard JK, Stephens M, Donnelly P. *Inference of population structure using multilocus genotype data*. Genetics, 2000; 155(2): 945–59.

Purcell S, Neale B, Todd-Brown K, Thomas L, Ferreira MA, Nikerson DA. *PLINK: a tool set for whole-genome association and population-based linkage analyses.* Am J Hum Genet, 2007; 81: 559–575.

Rahimi Z, Shahsavandi M, Bidoki K, Rezaei M. *MMP-9 (-1562 C:T) polymorphism as a biomarker of susceptibility to severe pre-eclampsia*. Biomark Med, 2013; 7(1):93-98.

Rausch ME, Barnhart KT. *Serum biomarkers for detecting ectopic pregnancy*. Clin Obstet Gynecol, 2012; 55(2):418-23.

Rassi A Jr, Rassi A. *Predicting prognosis in patients with Chagas disease: why are the results of various studies so different?* Int J Cardiol, 2010; 145(1):64-5; author reply 66-7.

Rendell VR, Gilman RH, Valencia E, Galdos-Cardenas G, Verastegui M, Sanchez L, Acosta J, Sanchez G, Ferrufino L, LaFuente C, Abastoflor Mdel C, Colanzi R, Bern C. *Trypanosoma cruzi-infected pregnant women without vectorexposure have higher parasitemia levels: implications for congenital transmission risk*. PLoS ONE, 2015; 10, e0119527.

Reyes MB, Lorca M, Munoz P, Frasch AC. *Fetal IgG specificities against Trypanosoma cruzi antigens in infected newborns.* Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A, 1990; 87, 2846–2850.

Risso MG, Garbarino GB, Mocetti E, Campetella O, Gonzalez Cappa SM, Buscaglia CA, Leguizamon MS. *Differential expression of a virulence factor, the trans-sialidase, by the main Trypanosoma cruzi phylogenetic lineages.* J Infect Dis, 2004;189(12):2250-9.

Rodriguez P, Truyens C, Alonso-Vega C, Flores A, Cordova M, Suarez E, Torrico F, Carlier Y. *Serum levels for IgM and IgA antibodies to anti-Trypanosomacruzi in samples of blood from newborns from mothers with positive serologyfor Chagas disease.* Rev. Soc. Bras. Med. Trop, 2005; 38 (Suppl 2), 62–64.

Rosenberg NA, Pritchard JK, Weber JL, Cann HM, Kidd KK. *Genetic structure of human populations*. Science, 2002; 298(5602): 2381–5.

Salas NA, Cot M, Schneider D, Mendoza B, Santalla JA, Postigo J, Chippaux JP, Brutus L. *Risk factors and consequences of congenital Chagas disease in Yacuiba, south Bolivia.* Trop. Med. Int. Health, 2007; 12, 1498–1505.

Sanchez Negrette O, Mora MC, Basombrio MA. *High prevalence of congenital Trypanosoma cruzi infection and family clustering in Salta, Argentina*. Pediatrics, 2005; 115(6): e668-673.

Sartori MJ, Lin S, Fretes RE, Ruiz Moreno L, Goldemberg L, de Fabro SP. *Alkaline phosphatase activity in plasma of pregnant chagasic patients.* Rev Fac Cien Med Univ Nac Cordoba. 1997; 55(1-2):5-8.

Sartori AM, Neto JE, Nunes EV, Braz LM, Caiaffa-Filho HH, Oliveira Oda C, Jr., Neto VA, Shikanai-Yasuda MA. *Trypanosoma cruzi parasitemia in chronic Chagas disease: comparison between human immunodeficiency virus (HIV)-positive and HIV-negative patients.* J Infect Dis, 2002; 186(6): 872-875.

Sartori MJ, Mezzano L, Lin S, Muñoz S, de Fabro SP*. Role of placental alkaline phosphatase in the internalization of trypomatigotes of Trypanosoma cruzi into HEp2 cells.* Trop Med Int Health, 2003; 8(9):832-9.

Sartori MJ, Mezzano L, Lin S, Repossi G, Fabro SP. *Cellular components and placental alkaline phosphatase in Trypanosoma cruzi infection.* Rev Soc Bras Med Trop, 2005; 38:87–91.

Scapellato PG, Bottaro EG, Rodriguez-Brieschke MT. *Mother-child transmission of Chagas disease: could coinfection with human immunodeficiency virus increase the risk?* Rev Soc Bras Med Trop, 2009; 42(2): 107-109.

Schenone H, Contreras MC, Borgoño JM, Rojas A, Villarroel F*. Congenital Chagas' disease in Chile. Longitudinal study of the reproductivity of women with or without Chagas' disease and of some parasitological and clinical parameters of them and their corresponding children.* Bol Chil Parasitol, 1985; 40:24-9.

Schijman AG, Altcheh J, Burgos JM, Biancardi M, Bisio M, Levin MJ, Freilij H. *Aetiological treatment of congenital Chagas' disease diagnosed and monitored by the polymerase chain reaction.* J Antimicrob Chemother, 2003; 52(3): 441-449.

Schijman AG, Lauricella MA, Marcet PL, Duffy T, Cardinal MV, Bisio M, Levin MJ, Kitron U, Gurtler RE. *Differential detection of Blastocrithidia triatomae and Trypanosoma cruzi by amplification of 24salpha ribosomal RNA genes in faeces of sylvatic triatomine species from rural northwestern Argentina*. Acta Trop, 2006; 99(1): 50-54.

Schmunis GA, Cruz JR. *Safety of the blood supply in Latin America*. Clin Microbiol Rev, 2005; 18(1): 12-29.

Sevini F, Yao DY, Lomartire L, Barbieri A, Vianello D, Ferri G, Moretti E, Dasso MC, Garagnani P, Pettener D, Franceschi C, Luiselli D, Franceschi ZA. *Analysis of population substructure in two sympatric populations of Gran Chaco, Argentina.* PLoS One, 2013; 22;8(5):e64054.

Shannon P, Markiel A, Ozier O, Baliga NS, Wang JT, Ramage D, Amin N, Schwikowski B, Ideker T. *Cytoscape: a software environment for integrated models of biomolecular interaction networks.* Genome Res, 2003; 13(11):2498-504.

Sharma KL, Misra S, Kumar A, Mittal B. *Higher risk of matrix metalloproteinase (MMP-2, 7, 9) and tissue inhibitor of metalloproteinase (TIMP-2) genetic variants to gallbladder cancer.* Liver Int, 2012; 32(8):1278-86.

Shaw GL, Quadagno D*. Trypanosoma lewisi and T. cruzi: effect of infection on gestation in the rat*. Exp. Parasitol, 1975; 37, 211–217.

Shikanai-Yasuda MA, Carvalho NB. *Oral transmission of Chagas disease.* Clin Infect Dis, 2012; 54(6): 845-853.

Shimajiri S, Arima N, Tanimoto A, Murata Y, Hamada T, Wang KY, Sasaguri Y*. Shortened microsatellite d(CA)21 sequence down-regulates promoter activity of matrix metalloproteinase 9 gene.* FEBS Lett, 1999; 455(1-2):70-4.

Siriano Lda R, Luquetti AO, Avelar JB, Marra NL, de Castro AM. *Chagas disease: increased parasitemia during pregnancy detected by hemoculture.* Am J Trop Med Hyg, 2011; 84(4):569-74.

Solana ME, Celentano AM, Tekiel V, Jones M, Gonzalez Cappa SM. *Trypanosoma cruzi: effect of parasite subpopulation on murine pregnancy outcome*. J. Parasitol, 2002; 88, 102–106.

Sosa-Estani S, Cura E, Velazquez E, Yampotis C, Segura EL. *Etiological treatment of young women infected with Trypanosoma cruzi, and prevention of congenital transmission.* Rev Soc Bras Med Trop, 2009; 42(5): 484-487.

St Jean PL, Zhang XC, Hart BK, Lamlum H, Webster MW, Steed DL, Henney AM, Ferrell RE. *Characterization of a dinucleotide repeat in the 92 kDa type IV collagenase gene (CLG4B), localization of CLG4B to chromosome 20 and the role of CLG4B in aortic aneurysmal disease.* Ann Hum Genet, 1995; 59(Pt 1):17-24.

Sturm NR, Campbell DA. *Alternative lifestyles: the population structure of Trypanosoma cruzi.* Acta Trop, 2010; 115(1-2):35-43.

Subramanian A, Tamayo P, Mootha VK, Mukherjee S, Ebert BL, Gillette MA, Paulovich A, Pomeroy SL, Golub TR, Lander ES, Mesirov JP. *Gene set enrichment analysis: a knowledge-based approach for interpreting genome-wide expression profiles*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2005; 102(43):15545-50

Talvani A, Rocha MOC, Barcelos LS, Gomes YM, Ribeiro AL, Teixeira MM. *Elevated concentrations of CCL2 and tumor necrosis factor-alpha in chagasic cardiomyopathy.* Clin Infect Dis, 2004; 38(7):943-50.

Tanowitz HB, Machado FS, Jelicks LA, Shirani J, de Carvalho AC, Spray DC, Factor SM, Kirchhoff LV, Weiss LM. *Perspectives on Trypanosoma cruzi-induced heart disease (Chagas disease)*.Prog Cardiovasc Dis, 2009; 51(6):524-39

Tao L, Suhua C, Juanjuan C, Zongzhi Y, Juan X, Dandan Z. *In vitro study on human cytomegalovirus affecting early pregnancy villous EVT's invasion function*. Virol J, 2011; 8:114.

The International HapMap Consortium. *Integrating ethics and science in the International HapMap Project.* Nat Rev Genet, 200; 5(6):467-75.

Thekisoe OM, Rodriguez CV, Rivas F, Coronel-Servian AM, Fukumoto S, Sugimoto C, Kawazu S y Inoue N. *Detection of Trypanosoma cruzi and T. rangeli infections from Rhodnius pallescens bugs by loop-mediated isothermal amplification (LAMP).* Am J Trop Med Hyg, 2010; 82(5): 855-860.

Thomas DC, Haile RW, Duggan D. *Recent developments in genomewide association scans: a workshop summary and review*. Am J Hum Genet, 2005; 77(3):337-45.

Tibayrenc M, Ayala FJ. *Towards a population genetics of microorganisms: The clonal theory of parasitic protozoa.* Parasitol Today, 1991; 7(9):228-33.

Tibayrenc M, Ayala FJ*. The clonal theory of parasitic protozoa: 12 years on.* Trends Parasitol, 2002; 18(9):405-10.

Ting WC, Chen LM, Pao JB, Yang YP, You BJ, Chang TY, Lan YH, Lee HZ, Bao BY. *Genetic polymorphisms of matrix metalloproteinases and clinical outcomes in colorectal cancer patients.* Int J Med Sci, 2013; 10(8):1022-7.

Torres OA, Calzada JE, Beraún Y, Morillo CA, González CI, González A, Martín J. Association of the macrophage migration inhibitory factor -173G/C polymorphism with Chagas disease. Hum Immunol, 2009; 70(7):543-6.

Torrico F, Alonso-Vega C, Suarez E, Rodriguez P, Torrico MC, Dramaix M, Truyens C, Carlier Y. *Maternal Trypanosoma cruzi infection, pregnancy outcome, morbidity, and mortality of congenitally infected and non-infected newborns in Bolivia*. Am J Trop Med Hyg, 2004; 70(2): 201-209.

Torrico F, Vega CA, Suarez E, Tellez T, Brutus L, Rodriguez P, Torrico MC, Schneider D, Truyens C, Carlier Y. *Are maternal re-infections with Trypanosoma cruzi associated with higher morbidity and mortality of congenital Chagas disease?* Trop Med Int Health, 2006; 11:628-35.

Truyens C (a), Hermann E, Alonso-Vega C, Rodriguez P, Vekemans J, Torrico F, Carlier, Y. *Immune responses of non-infected neonates of mothers infected with Trypanosoma cruzi.* Rev. Soc Bras Med Trop, 2005; 38 (Suppl 2), 96–100.

Truyens C (b), Mjihdi K, Lambot MA, Rivera MT, Noël JC, Carlier Y. *Effects of acute and chronic Trypanosoma cruzi infection in pregnant mice*. Rev Soc Bras Med Trop, 2005; 38 Suppl 2:68-73.

Truyens C, Carlier Y. *Protective host response to Trypanosoma cruzi parasiteand its limitations.* Telleria J, Tibayrenc M. *American Trypanosomiasis – Chagas disease. One Hundred Years of Research.* Elsevier, London, UK/Burlington, MA, USA, 2010; pp. 601–668.

Valadares HM, Pimenta JR, de Freitas JM, Duffy T, Bartholomeu DC, Oliveira Rde P, Chiari E, Moreira Mda C, Filho GB, Schijman AG, Franco GR, Machado CR, Pena SD, Macedo AM. *Genetic profiling of Trypanosoma cruzi directly in infected tissues using nested PCR of polymorphic microsatellites*. Int J Parasitol, 2008; 38(7):839-50.

Vasconcelos RHT, Montenegro SML, Azevedo E a N, Gomes YM, Morais CNL. *Genetic susceptibility to chronic Chagas disease: an overview of single nucleotide polymorphisms of cytokine genes.* Cytokine, 2012; 59(2):203-8.

Vasků V, Vasků A, Tschöplová S, Izakovicová Hollá L, Semrádová V, Vácha J. *Genotype association of C(-735)T polymorphism in matrix metalloproteinase 2 gene with G(8002)A endothelin 1 gene with plaque psoriasis.* Dermatology, 2002; 204(4):262-5.

Vekemans J, Truyens C, Torrico F, Solano M, Torrico MC, Rodriguez P, Alonso-Vega C, Carlier Y. *Maternal Trypanosoma cruzi infection upregulatescapacity of uninfected neonate cells to produce pro- and anti-inflammatorycytokines*. Infect Immun, 2000; 68, 5430–5434.

Vieira MC, de Carvalho TU, de Souza W. *Effect of protein kinase inhibitors on the invasion process of macrophages by Trypanosoma cruzi*. Biochem Biophys Res Commun, 1994; 203(2):967-71.

Viotti R, Vigliano C. *Etiological treatment of chronic Chagas disease: neglected 'evidence' by evidence-based medicine*. Expert Rev Anti Infect Ther, 2007; 5(4): 717-726.

Viotti R, Alarcón de Noya B, Araujo-Jorge T, Grijalva MJ, Guhl F, López MC, Ramsey JM, Ribeiro I, Schijman AG, Sosa-Estani S, Torrico F, Gascon J; Latin American Network for Chagas Disease, NHEPACHA. *Towards a paradigm shift in the treatment of chronic Chagas disease.* Antimicrob Agents Chemother,2014; 58(2):635-9.

Virreira M, Alonso-Vega C, Solano M, Jijena J, Brutus L, Bustamante Z, Truyens C, Schneider D, Torrico F, Carlier Y, Svoboda M. *Congenital Chagas disease in Bolivia is not associated with DNA polymorphism of Trypanosoma cruzi.* Am J Trop Med Hyg, 2006; 75, 871–879.

Virreira M, Truyens C, Alonso-Vega C, Brutus L, Jijena J, Torrico F, Carlier Y, Svoboda M. *Comparison of Trypanosoma cruzi lineages and levels of parasitic DNA in infected mothers and their newborns*. Am J Trop Med Hyg, 2007; 77,102–106.

Virreira Winter S, Niedelman W, Jensen KD, Rosowski EE, Julien L, Spooner E, Caradonna K, Burleigh BA, Saeij JP, Ploegh HL, Frickel EM. *Determinants of GBP recruitment to Toxoplasma gondii vacuoles and the parasitic factors that control it.* PLoS One, 2011; 6(9):e24434.

Wang L, Guo L, Tian F, Hao R, Yang T. *Analysis of single nucleotide polymorphisms within ADAM12 and risk of knee osteoarthritis in a Chinese Han population.* Biomed Res Int, 2015; 2015:518643.

Werner H, Kunert H. *Causes of congenital protozoa infection*. Z. Tropenmed Parasitol, 1958; 9, 17–27.

Yamamoto M, Okuyama M, Ma JS, Kimura T, Kamiyama N, Saiga H, Ohshima J, Sasai M, Kayama H, Okamoto T, Huang DC, Soldati-Favre D, Horie K, Takeda J, Takeda K. *A cluster of interferon-γ-inducible p65 GTPases plays a critical role in host defense against Toxoplasma gondii.* Immunity, 2012; 37(2):302-13.

Ye S. *Polymorphism in matrix metalloproteinase gene promoters: implication in regulation of gene expression and susceptibility of various diseases.* Matrix Biol, 2000; 19(7):623-9.

Yu C, Pan K, Xing D, Liang G, Tan W, Zhang L, Lin D. *Correlation between a single nucleotide polymorphism in the matrix metalloproteinase-2 promoter and risk of lung cancer.* Cancer Res, 2002; 62(22):6430-3.

Yu C, Zhou Y, Miao X, Xiong P, Tan W, Lin D. *Functional haplotypes in the promoter of matrix metalloproteinase-2 predict risk of the occurrence and metastasis of esophageal cancer.* Cancer Res, 2004; 64(20):7622-8.

Zafra G, Morillo C, Martín J, González A, González CI. *Polymorphism in the 3' UTR of the IL12B gene is associated with Chagas' disease cardiomyopathy.* Microbes Infect, 2007; 9(9):1049-53.

Zhang B, Ye S, Herrmann SM, Eriksson P, de Maat M, Evans A, Arveiler D, Luc G, Cambien F, Hamsten A, Watkins H, Henney AM. *Functional polymorphism in the regulatory region of gelatinase B gene in relation to severity of coronary atherosclerosis.* Circulation, 1999; 99(14):1788-94.

Zhao Q. *Dual targeting of CCR2 and CCR5: therapeutic potential for immunologic and cardiovascular diseases*. J Leukoc Biol, 2010; 88(1):41-55.

Zhou Y, Yu C, Miao X, Tan W, Liang G, Xiong P, Sun T, Lin D. *Substantial reduction in risk of breast cancer associated with genetic polymorphisms in the promoters of the matrix metalloproteinase-2 and tissue inhibitor of metalloproteinase-2 genes.* Carcinogenesis, 2004; 25(3):399-404.

Zicker F, Smith PG, Netto JC, Oliveira RM, Zicker EM. *Physical activity, opportunity for reinfection, and sibling history of heart disease as risk factors for Chagas' cardiopathy.* Am J Trop Med Hyg, 1990; 43(5): 498-505.

Zingales B, Andrade SG, Briones MR, Campbell DA, Chiari E, Fernandes O, Guhl F, Lages- Silva E, Macedo AM, Machado CR, Miles MA, Romanha AJ, Sturm NR, Tibayrenc M, Schijman AG. *A new consensus for Trypanosoma cruzi intraspecific nomenclature: second revision meeting recommends TcI to TcVI.* Mem Inst Oswaldo Cruz, 2009; 104(7): 1051-1054.

Zingales B, Miles MA, Campbell DA, Tibayrenc M, Macedo AM, Teixeira MM, Schijman AG, Llewellyn MS, Lages-Silva E, Machado CR, Andrade SG, Sturm NR. *The revised Trypanosoma cruzi subspecific nomenclature: rationale, epidemiological relevance and research applications.* Infect Genet Evol, 2012; 12(2):240-53.

APÉNDICE

% p/v	Porcentaje peso/volumen
% v/v	Porcentaje volumen/volumen
°C	Grados centígrados
ADN	Ácido desoxirribonucleico
ADNk	Ácido desoxirribonucleico del cinetoplasto
ANOVA	Análisis de la varianza
ARN	Ácido ribonucleico
ARNr	Ácido ribonucleico ribosomal
BENEFIT	Benznidazole Evaluation for Interrupting Trypanosomiasis
BSA	Seroalbúmina bovina
BTA	Balanced testing accuracy
CChC	Cardiopatía chagásica crónica
CCR2	C-C quimioquina receptora de tipo 2
CCR5	C-C quimioquina receptora de tipo 5
Ct	Ciclo umbral
CVC	Cross-validation consistency
DEG	Differentially Expressed Gene
DJ	Distancia de Jaccard
dNTPs	Dideoxinucleótidos trifosfato
ECG	Electrocardiograma
EDTA	Ácido tetra-acético de etilendiamina
ELISA	Ensayo de inmunoabsorción ligado a enzimas
FC	Fold Change
FDR	false discovery rate
FRET	Transferencia de energía de resonancia de Förster
g	Gramos
GE	Buffer Guanidina EDTA
GEB	Mezcla sangre + GE
GO	Gene Ontology
GSEA	Gene Set Enrichment Analysis
GWAS	Genome-wide association study
H2O	Agua
HAI	Ensayo de hemaglutinación indirecta
HRMA	High Resolution Melting Analysis
HWE	Equilibrio de Hardy – Weinberg
IAC	Control interno de amplificación
IFI	Inmunofluorescencia
IFN-γ	Interferón gamma
IG	Information gain
IgA	Inmunoglobulina A
IgM	Inmunoglobulina M
IL-18	Interleuquina 18
IL-1β	Interleuquina 1β
IL-4	Interleuquina 4

IL-6	Interleuquina 6
INTA	Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria
kb	Kilopares de bases
L	Litro
LAMP	Loop-mediated isothermal amplification
LD	Desequilibrio de ligamiento
LPE	Local Pooled Error
M	Molar
MAF	Minor Allele Frequence
Mg^{2+}	Iones magnesio
MIF	Factor inhibitorio de la migración de macrófagos
Min	Minutos
MINCyT	Ministerio de Ciencia, Tecnología e Innovación Productiva
mL	Mililitros
MLEE	Multi-Locus Enzyme Electrophoresis
mM	Milimolar
MMP	Metaloproteinasas de matriz
MSL	Multi-Locus sequence typing
N	Normal
NCBI	National Center for Biotechnology Information
NES	Normalized Enrichment Score
Nm	Nanómetro
OMS	Organización Mundial de la Salud
OR	Odd Ratio
PAMPs	Patrones moleculares asociados a patógenos
pb	Pares de bases
PBS	Tampón fosfato salino
PCR	Reacción en cadena de la polimerasa
PLAP	Fosfatasa Alcalina Placentaria
qPCR	PCR en tiempo real
RFLP	Restriction fragment length polymorphism
rpm	Revoluciones por minuto
RT-qPCR	Reverse transcription quantitative polymerase chain reaction
SDS	Dodecilsulfato de sodio
seg	Segundos
SNP	Polimorfismo de nucleótido único
TAE	Tampón Tris-acetato EDTA
TBE	Tampón Tris-borato EDTA
TBS	Tampón Tris-salino
TEMED	N,N,N',N'-Tetrametiletilendiamina
TGF-β	Factor de crecimiento transformante β
Tm	Temperatura de "melting" o de fusión
TNFRI	Receptor del Factor de necrosis tumoral I
TNF-α	Factor de necrosis tumoral alpha

Tris	Tris(hidroximetil)-aminometano
U	Unidades
UBA	Universidad de Buenos Aires
UDT	Unidades discretas de tipificación
UNNE	Universidad Nacional del Nordeste
UNU BIOLAC	Programa de la Universidad de las Naciones Unidas Biotecnología para América Latina y El Caribe
UV	Ultravioleta
V	Voltios
VIH	Virus de la inmunodeficiencia humana
µg	Microgramos
µL	Microlitros
µM	Micromolar

Tabla A1. *Fold change* (FC) y valores de p ajustados de los resultados del microarreglo.

Valores de *fold change* y valores de p ajustados resultados del microarreglo entre los grupos infectados, K98 y VD, con respecto al control sin infección. Se muestran aquellos genes con expresión diferencial: FC ≥ l1,5l y p < 0,05. La tabla puede descargarse bajo el título de Tabla A1 siguiendo el enlace:

https://drive.google.com/drive/folders/0B34TNm4sbrGuQ1V3N3BpQVVVUHM?usp=sharing

Tabla A2. Resultados obtenidos por GeneMANIA.

Vías significativas con sus números de identificación en *Gene Ontology* (GO ID) que resultaron del microarreglo entre los grupos infectados, K98 y VD, con respecto al control sin infección. Los valores de FDR (también conocido como q-valor) se listan en la tercera columna. La tabla puede descargarse bajo el título de Tabla A2 en el siguiente enlace:

https://drive.google.com/drive/folders/0B34TNm4sbrGuQ1V3N3BpQVVVUHM?usp=sharing

Tabla A3. Resultados obtenidos por GSEA.

Procesos biológicos significativos obtenidos por GSEA, número de genes que conforman cada conjunto génico (*SIZE*), la puntuación de enriquecimiento normalizada (*NES*) y el valor q del FDR (*FDR.q.value*), comparando los grupos infectados, K98 y VD, con respecto al control. La tabla puede descargarse bajo el título de Tabla A3 siguiendo el enlace:

https://drive.google.com/drive/folders/0B34TNm4sbrGuQ1V3N3BpQVVVUHM?usp=sharing