

POLIMORFISMOS DEL RECEPTOR DE GLUCOCORTICOIDES: ¿POSIBLES MARCADORES PREDICTIVOS DE CARDIOPATÍA CHAGÁSICA?

Simonetto, Antonela

*Laboratorio de Biología Molecular e Inmunología Aplicadas
Facultad de Bioquímica y Ciencias Biológicas (UNL)*

Área: Ciencias Biológicas

Sub-Área: Bioquímica

Grupo: X

Palabras claves: Chagas, polimorfismos, HRM.

INTRODUCCIÓN

La enfermedad de Chagas continúa siendo una enfermedad desatendida en el mundo, no hay vacunas disponibles, y la única droga antiparasitaria sólo es eficiente en la fase aguda de la enfermedad. En Argentina, existen alrededor de 2 millones de personas infectadas, de las cuales 600.000 presentan distintos grados de manifestación cardíaca (Storino R et al., 2002). No se conoce por completo por qué la infección presenta una evolución clínica tan variable, desde ausencia completa de síntomas, hasta lesiones cardiovasculares y gastrointestinales de diferente severidad. La cepa parasitaria y las características inmunogenéticas del hospedero, entre otros, podrían estar influyendo en la patogénesis de la enfermedad de Chagas (revisado por Bonney KM y Engman DM, 2015). Conocido el papel de la inflamación en la génesis y progresión de esta enfermedad, ha cobrado interés el estudio de la participación del sistema inmunoendócrino en la inmunidad anti infecciosa, como se ha demostrado en estudios experimentales de infección por *T. cruzi* (Roggero E et al., 2006). La disrupción de estas interacciones inmunoendócrinas se ha encontrado asociada a síndromes que incluyen enfermedades inflamatorias, autoinmunes y cardiovasculares. Las mismas podrían estar relacionadas con polimorfismos en los genes de moléculas claves en esta interacción, como por ejemplo el receptor de glucocorticoides (NR3C1), modificando la sensibilidad a la acción del cortisol endógeno. Entre los funcionalmente más relevantes se encuentran los polimorfismos de un único nucleótido (SNP) N363S, BclI y GR-9 β (Manenschijn L et al., 2009) asociados principalmente a enfermedades inflamatorias crónicas y algunos en particular a enfermedades coronarias (Koper J K et al., 2014).

Por esta razón, nuestro objetivo es evaluar los polimorfismos N363S, BclI y GR-9 β en una población de infectados chagásicos crónicos con y sin cardiopatía a fin de determinar si existe asociación entre ellos. Hasta el presente, hemos evaluado el GR-9 β mediante la técnica de Disociación de alta resolución (HRM, del inglés "High Resolution Melting"). La eventual asociación de estos polimorfismos con el desarrollo de cardiopatía chagásica crónica (CCC) permitirá lograr una mayor comprensión de los mecanismos que subyacen la enfermedad y evaluar el posible uso de los mismos como marcadores predictivos en individuos asintomáticos.

OBJETIVOS

Objetivo general

- Evaluar SNPs en el gen del receptor de glucocorticoides (GR) en individuos infectados con distintos linajes de *T. cruzi* a fin de correlacionarlos con la evolución clínica de la enfermedad de Chagas.

Proyecto: CAI+D2011

Director del proyecto: Diez, Cristina Noemí

Director del becario: Diez, Cristina Noemí

Objetivos específicos

- Purificar ADNg a partir de muestras de sangre de individuos infectados con diferentes linajes de *T. cruzi*.
- Poner a punto la técnica de HRM para la evaluación del SNP GR-9β del GR.
- Evaluar el SNP GR-9β en las muestras purificadas.

METODOLOGÍA

Se purificó ADN genómico (ADNg) de muestras de sangre conservadas en guanidina/EDTA (6M/0,1M) con el kit AccuPrep® Genomic DNA Extraction Kit. Se evaluó la calidad de purificación y la concentración de ADN, utilizando un espectrofotómetro Thermo Scientific NanoDrop™.

Se diseñaron *primers* para amplificar las regiones de los genes que contienen los polimorfismos *BclI*, GR9β y N363S del receptor de glucocorticoides. Se utilizaron los programas *on line* Primer-BLAST y Primer3web version 4.0.0.

A los efectos de la evaluación de estos polimorfismos del NR3C1, se diseñó una secuencia de ADN que incluyó los genes a estudiar con sus mutaciones respectivas, para su posterior utilización como material de referencia de genes mutados. Esta secuencia se envió para su síntesis (gBlock - IDT & Biodynamics-Argentina Portal Group) y, posteriormente, se amplificó por PCR para obtener mayor cantidad de ADN molde. El fragmento amplificado se clonó en la cepa DH5α de *Escherichia coli*, utilizando el vector pGEM®-T Easy Vector (Promega). La verificación del clonado se realizó por PCR y corrida electroforética en gel de agarosa al 2% teñido con GelRed. La purificación de ADN plasmídico (ADNp) se realizó con el kit comercial “Wizard Plus SV Minipreps DNA Purification System” (Promega), determinándose concentración y pureza en Nanodrop.

En esta primera etapa, se estudió el SNP GR-9β por HRM. Ésta es una técnica basada en el estudio y comparación de curvas de fusión de las cadenas de ADN obtenidas de una amplificación previa del gen de interés por PCR en tiempo real (PCR-TR), utilizando colorantes fluorescentes. Para la puesta a punto y optimización de la HRM se evaluaron distintas concentraciones de ADN molde y *primers*. Para ello se trabajó con muestras de referencia: Homocigotas para gen salvaje (sin mutaciones), obtenidas a partir de muestras de ADNg de individuos confirmados como homocigotas para el gen salvaje; homocigotas para gen mutado, obtenidas del ADNp que contiene los genes mutados; y heterocigotas, preparadas artificialmente por mezcla de las dos anteriores. Se evaluaron las siguientes concentraciones de *primers*: (0,4-0,8-1,2) μM. Se probaron las siguientes concentraciones de ADNg: (7,5-15-20-25-30-35) ng/μl. Para la puesta a punto de la concentración del control mutado, se realizaron diluciones seriadas 1/5 desde 130 ng/μl hasta 9*10⁻⁴ ng/μl. La PCR-TR se realizó en un termociclador StepOne™ Real-Time PCR Systems, utilizando como mezcla de reacción HOT FIREPol® EvaGreen® qPCR Mix. La HRM se analizó con Applied Biosystems® HRM Software. Los programas utilizados se describen en la **Tabla 1** y en la **Tabla 2**.

Tabla 1. Programa de PCR-TR para la amplificación del exón 9β del gen del GR.

Ciclos	Temperatura (°C)	Tiempo
1	95	15 min
40	95	15 seg.
	60	15 seg.
	72	15 seg.

Tabla 2. Programa de HRM para GR-9β.

Temperatura (°C)	Tiempo
95	10 seg.
60	1min*
95	15 seg.
60	15 seg.

*El aumento de temperaturas se hace en intervalos de 0,3°C

Una vez optimizada la técnica, se caracterizaron las muestras de ADNg de individuos infectados crónicos. Hasta el presente, fueron evaluadas 69 muestras.

RESULTADOS/CONCLUSIONES

Resultados

Purificación de ADN: De las lecturas de ADNg y ADNp en Nanodrop, se obtuvo en todos los casos un índice de pureza entre 1,8 y 2, adecuado para este análisis.

Clonado del gen polimórfico: De las 8 colonias evaluadas para verificar el clonado del fragmento con genes mutados, 4 amplificaron el tamaño esperado.

Optimización de HRM: De los parámetros evaluados, la concentración óptima de *primers* fue **1,2 µM**, la de ADNg fue de **7,5 ng/µl** y la de ADNp de **9*10⁻³ fg/µl**.

En la **Tabla 3** se muestra la composición de la mezcla de reacción para la PCR-TR.

Tabla 3. Composición de la mezcla de reacción para la amplificación del exón 9β del gen del GR.

Reactivos	Volumen (ul)
Eva Green	2
Primer F	0,3
Primer R	0,3
Agua miliQ estéril	5,4
Muestra	2

En la **Figura 1**, se observa el CT (nº ciclo a partir del cual comienzan a emitir fluorescencia los productos) óptimo obtenido en la amplificación mediante PCR-TR, que, bajo estas condiciones varió entre 21,6- 24 (recomendados por la guía HRM Applied Biosystems).

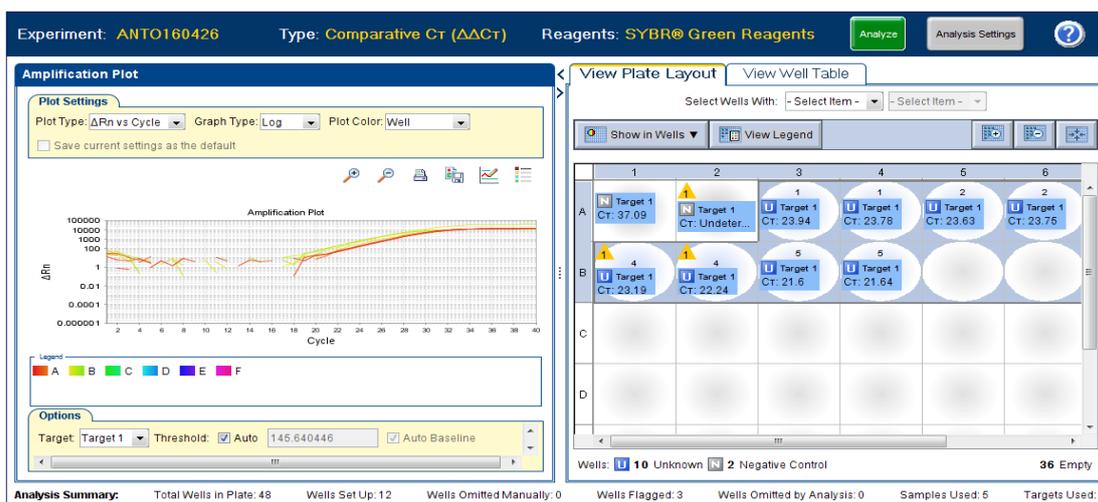


Figura 1. PCR-TR de la puesta a punto para la evaluación del polimorfismo GR-9β del GR.

En la HRM realizada sobre los productos amplificados, las temperaturas de fusión o *melting* (T_m) fueron de 76,9°C en las muestras homocigotas para el gen mutado, de 76,2°C en las homocigotas para el gen salvaje y de 76,3°C en las heterocigotas. En la **Figura 2** se muestran las gráficas de la curva de *melting* obtenida por el software

Applied Biosystems® HRM. Se diferenciaron 2 variantes: 1, correspondiente a muestras homocigotas para gen mutado (en rojo en la gráfica Difference Plot); 2, correspondiente a homocigota para gen salvaje (azul en la gráfica). Las heterocigotas se diferencian por la forma de la curva (azul ondeada en la gráfica Difference Plot).

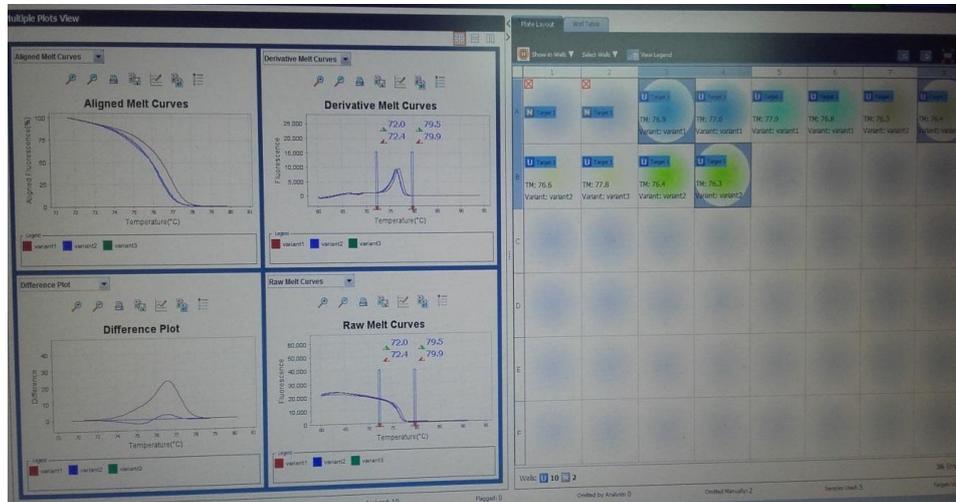


Figura 2. Resultados de HRM de las tres variantes (homocigota mutada- homocigota salvaje- heterocigota) del análisis del polimorfismo GR9 β del GR.

Evaluación de muestras: Se identificaron 62 portadoras homocigotas para el gen salvaje, 6 heterocigotas y 1 homocigota para el gen mutado.

Conclusiones

- Se sintetizó y clonó eficazmente el gen completo con los 5 genes para usar como controles mutados de los polimorfismos a evaluar.
- Se optimizó la técnica de HRM para la identificación del polimorfismo SNP del exón 9 β del gen del GR, logrando la diferenciación de las tres variantes: Homocigota mutado, homocigota salvaje y heterocigota.
- De las 69 muestras de infectados crónicos con *T. cruzi* evaluadas, se obtuvo un 89,9% de portadores homocigotas para el gen salvaje, 8,7% de heterocigotas y 1,4% de portadores homocigotas para el gen mutado.
- Con un mayor número de muestras se evaluará la asociación con CCC.

BIBLIOGRAFÍA BÁSICA

- Bonney K., Engman D., 2015. Autoimmune pathogenesis of Chagas heart disease: looking back, looking a head. *Am J Pathol.*, 185(6), 1537-47.
- Koper J., van Rossum E., van den Akker E., 2014. Glucocorticoid receptor polymorphisms and haplotypes and their expression in health and disease. *Steroids*, 92, 62–73.
- Manenschijn L., van den Akker E., Lamberts S., van Rossum E., 2009. Clinical Features Associated with Glucocorticoid Receptor Polymorphisms. An Overview. *Glucocorticoids and Mood: Ann. N.Y. Acad. Sci.*, 1179, 179–198.
- Roggero E., Pérez A., Tamae-Kakazu M., Piazzon I., Nepomnaschy I., Besedovsky H., et. al., 2006. Endogenous glucocorticoids cause thymus atrophy but are protective during acute *Trypanosoma cruzi* infection. *JEndocrinol.*, 190, 495–503.
- Storino R., Jörg M., Auger S., 2002. Manual práctico de la atención médica del paciente chagásico. Ed. Masson. Doyma, Buenos Aires, Argentina.