

ESTUDIO DE POLIMORFISMOS EN LAS REGIONES PROMOTORAS DE LOS GENES DE IL-10 E IL-6 Y SU ASOCIACIÓN CON LA CARDIOPATÍA CHAGÁSICA

Fornero, Paola

*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, cardiopatía.

INTRODUCCIÓN

La enfermedad de Chagas es una infección parasitaria de sangre y tejidos causada por el protozoo hemoflagelado *Trypanosoma cruzi* (WHO, 2007). Lamentablemente continúa siendo una enfermedad desatendida en el mundo, no hay vacunas disponibles, y la única droga antiparasitaria sólo es eficiente en la fase aguda. La enfermedad de Chagas, transcurre primero en una etapa silenciosa, asintomática, que se mantiene por 10 a 20 años y luego pueden presentarse manifestaciones clínicas en alrededor del 30% de los individuos infectados, comprometiendo fundamentalmente al corazón (Moncayo, 1999). En Argentina, existen alrededor de 2 millones de personas infectadas, de las cuales 600.000 presentan distintos grados de manifestación cardíaca (Storino y col., 2002). Hasta el presente no se conocen con certeza los factores que determinan la evolución de la infección chagásica hacia la enfermedad cardíaca. Se sabe que la inflamación juega un papel importante en la génesis y progresión de la enfermedad (Roggero y col., 2006). Además se ha encontrado asociación entre el desbalance en la inmunoregulación y el desarrollo de enfermedades inflamatorias, autoinmunes y cardiovasculares (Tait y col., 2008). Por lo tanto, en la permanente interacción parásito-hospedero, las características inmunogenéticas del hospedero así como la genética de *T. cruzi*, podrían estar influyendo en la patogénesis de la enfermedad (Bonney y Engman, 2015). Por ejemplo, polimorfismos asociados con moléculas inmunes, podrían contribuir a este desequilibrio inmunoregulatorio. El polimorfismo de nucleótido único en la región promotora de la IL-10 (SNP -1082 A/G), asociado con su mayor expresión (Costa y col., 2009), podría estar interviniendo en su función como citoquina reguladora de la respuesta inflamatoria frente a la progresión de la cardiopatía chagásica crónica (CCC). Asimismo, el polimorfismo de base única de la IL-6 (SNP -174 G/C) localizado en su región promotora, asociado a una menor expresión (Rego-Pérez y col., 2009), podría modificar su acción como citoquina pro-inflamatoria. Por esta razón, es de interés evaluar los polimorfismos asociados a estas citoquinas, a fin de correlacionarlos con la evolución clínica de la enfermedad de Chagas. Esto permitirá lograr una mayor comprensión de los mecanismos que subyacen la enfermedad y evaluar el posible uso de los mismos como marcadores predictivos.

Proyecto: CAI+D2011. Marcadores genéticos asociados a la regulación inmunoendócrina: potenciales agentes pronósticos de la evolución hacia la cardiopatía chagásica crónica.

Director del proyecto: Diez, Cristina Noemí.

Director del pasante alumno: Diez, Cristina Noemí

OBJETIVOS

Objetivo general:

- Evaluar los polimorfismos de nucleótido único: SNP -1082 A/G y SNP -174 G/C de la regiones promotoras de las citoquinas IL-10 e IL-6, respectivamente, en una población de individuos infectados, asintomáticos y con CCC demostrada.

Objetivos específicos:

- Purificar ADN genómico a partir de muestras de sangre de individuos chagásicos con más de 20 años de adquirida la infección.
- Evaluar los SNPs de la IL-10 e IL-6 en las muestras purificadas mediante HRM.
- Analizar la asociación de los polimorfismos con CCC

METODOLOGÍA

Se trabajó con muestras de sangre de individuos con Chagas crónico con más de 20 años de infección. Estos individuos fueron evaluados y clasificados como asintomáticos o con CCC, según sus datos epidemiológicos y clínicos. Se purificó ADN genómico (ADNg) de muestras de sangre conservadas en guanidina/EDTA (6M/0,1M) con el kit AccuPrep® Genomic DNA Extraction Kit, siguiendo las especificaciones del comerciante. Se evaluó la calidad de purificación y la concentración de ADN por lecturas de DO a 260 y 280 nm, utilizando un espectrofotómetro Thermo Scientific NanoDrop™. Cada grupo de purificación se realizó con su respectivo control negativo y las muestras de ADN se conservaron a -70°C hasta su utilización.

Se diseñaron *primers* para amplificar las regiones promotoras de los genes que contienen los polimorfismos de la IL-10 (SNP-1082 A/G) y de la IL-6 (SNP -174 G/C). Se utilizaron los programas *on line* Primer-BLAST y Primer3web version 4.0.0.

Dichos amplificadores se obtuvieron por PCR en tiempo real (RT-PCR), en el termociclador StepOne™ Real-Time PCR Systems, Applied Biosystems, utilizando como mezcla de reacción HOT FIREPol® EvaGreen® qPCR Mix, según indicaciones del comerciante y previa optimización de la técnica. Para obtener la concentración adecuada de ADN, se hicieron diluciones a partir del ADN purificado. El programa utilizado en la RT-PCR y la mezcla de reacción se describen en las **Tablas 1 y 2**.

Tabla 1. Programa de RT-PCR para la amplificación de región promotora de IL-10 e IL-6.

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

*58°C para IL-6 y 59°C para IL-10

Tabla 2. Composición de la mezcla de reacción de RT-PCR para la amplificación de la región promotora de IL-10 e IL-6.

Reactivos (conc.)	Volumen (ul)
Eva Green (2 X)	2
Primer F (1,2 uM)	0,3
Primer R (1,2 uM)	0,3
Agua miliQ estéril	5,4
Muestra (7,5 ng/ul)	2

Se evaluaron los polimorfismos correspondientes a partir del ADN amplificado, mediante la técnica de disociación de alta resolución, HRM (del inglés "High Resolution Melting"). La misma permite diferenciar las muestras homocigotas para el

gen nativo (sin mutaciones; HN), homocigotas para el gen mutado (con mutaciones en ambos alelos; HM) y heterocigotas (con un solo alelo mutado; H), de acuerdo a diferencias en las temperaturas de disociación de la doble cadena de ADN y a las curvas de emisión de fluorescencia vs temperatura. Cada muestra fue procesada por duplicado y se utilizó para cada polimorfismo muestras de referencia: HM, ADN obtenido por síntesis y clonado de la secuencia génica con la mutación, HN, obtenido a partir de muestras de ADNg de individuos sin mutación en el gen y H, obtenido por mezcla de los dos anteriores. Las condiciones del programa utilizado se muestran en la **Tabla 3**. La HRM fue analizada mediante Applied Biosystems® HRM Software.

Tabla 3. Programa de HRM para la evaluación de SNPs de la IL-10 e IL-6

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

*El aumento de temperatura de 60°C a 95°C, se realiza en intervalos de 0,3°C.

Para el análisis de los datos se utilizó el software STATA versión 9. Se aplicaron las pruebas Chi-cuadrado de Pearson, Test de Fisher, Odds ratio, según correspondiera. Para todas las pruebas se fijó un nivel de significación menor a 0,05.

RESULTADOS/CONCLUSIONES

De las lecturas de ADNg en Nanodrop, se obtuvo un índice de pureza entre 1,8 y 2, adecuado para este análisis.

De las 65 muestras evaluadas hasta el presente para el SNP IL-10, la proporción del genotipo AA fue de 45,5% en los asintomáticos y de 68,8% en los cardiopatas, mientras que para el genotipo heterocigota AG fue de 54,6% y 31,3%, respectivamente ($p=0.056$); siendo semejante para el genotipo GG (3% y 2,9% respectivamente).

Para el SNP IL-6, de las 35 muestras evaluadas hasta el momento, se obtuvo 52,9% y 72,2% de genotipo GG y 41,2% y 22,2% de heterocigotas GC en los asintomáticos y cardiopatas respectivamente ($p=0.282$). La distribución del genotipo CC fue similar en ambas poblaciones.

Las gráficas obtenidas por el software Applied Biosystems® HRM se muestran en las **Figuras 1 y 2**. En la **Figura 1** se muestra la gráfica *Derivative Melt Curves* (derivada de la fluorescencia en función de la temperatura) y las correspondientes temperaturas de melting (T_m) para cada muestra. En la **Figura 2** se muestran la gráficas, *Aligned Melt Curves* (curva de temperaturas de fusión alineadas: muestra la disminución de la fluorescencia cuando el ADN de doble cadena se desdobra a simple cadena) y *Difference Plot* (muestra las diferentes formas que adquieren las curvas de fusión cuando se restan a una curva utilizada como referencia). Las muestras HM aparecen en Rojo (variante 1), HN en azul (variante 2), con igual forma de las curvas pero distinta T_m , y las muestras H, se diferencian por la forma de la curva azul ondeada.



Figura 1. Resultados de HRM. *Derivate Melt Curves*. Tm de las muestras.

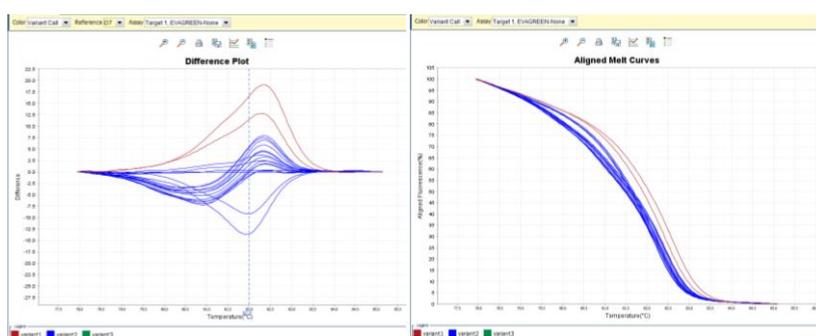


Figura 2. Gráficas *Difference Plot* y *Aligned Melt Curves*. HM: rojo; HN: azul; H: azul ondeada.

De los resultados obtenidos en la evaluación de ambos polimorfismos, se podría asociar la mayor frecuencia del alelo G del SNP IL-10, con un efecto protector dentro de los individuos que no desarrollaron CCC a lo largo de 20 años de infección. Efecto similar podría estar ejerciendo el alelo C del SNP IL-6, presente en mayor frecuencia dentro de esta misma población, si bien la diferencia de proporciones con los cardiopatas no alcanzó significación estadística. La evaluación de un número mayor de individuos y el análisis del efecto combinado de estos dos polimorfismos, permitirá analizar mejor esta tendencia.

BIBLIOGRAFÍA BÁSICA

- **Bonney K., Engman D.** 2015. Autoimmune pathogenesis of Chagas heart disease: looking back, looking a head. *Am J Pathol.*, 185(6), 1537-1547.
- **Costa G., Otávio da Costa Rocha M., Rocha Moreira P., Silva Menezes C., Silva M., Gollob K., Dutra W.** 2009. Functional IL-10 Gene Polymorphism Is Associated with Chagas Disease Cardiomyopathy. *JID*; 199, 451– 454.
- **Moncayo A.**, 1999. Progress towards interruption of transmission of Chagas disease. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz*, 94 (Suppl. 1), 401-404.
- **Rego-Pérez I., Fernández-Moreno M., Carreira-García V., Blanco F.** 2009. Polimorfismos genéticos y farmacogenética en la artritis reumatoide. *Rev. España.*
- **Roggero E., Pérez A., Tamae-Kakazu M., Piazzon I., Nepomnaschy I., Besedovsky H., y col.** 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.
- **Tait A., Butts C., Sternberg E.** 2008. The role of glucocorticoids and progestins in inflammatory, autoimmune, and infectious disease. *J Leukoc Biol*, 84(4), 924-931.
- **WHO.** 2007. "Special Programme for Research and Training in Tropical Diseases (TDR)." Report of Scientific group in Chagas disease.; 1533–1543.