



Variabilidad del gen IL-10 y susceptibilidad a la tuberculosis pulmonar en pacientes Venezolanos

Zhenia Fuentes ¹.

Rafael Villasmil ².

Mercedes Fernández-Mestre ³.

Violeta Ogando ⁴.

Lisseloth Garrido ⁵.

José Luis Molina ⁶.

¹Unidad de Tórax, Hospital Dr. José Ignacio Baldó- El Algodonal, Caracas
zheniaff@hotmail.com

²Unidad de Tórax, Hospital Dr. José Ignacio Baldó. El Algodonal, Caracas.

Sección Inmunogenética, Laboratorio de Fisiopatología, Centro de Medicina Experimental, Instituto Venezolano de Investigaciones Científicas

³Sección Inmunogenética, Laboratorio de Fisiopatología, Centro de Medicina Experimental, Instituto Venezolano de Investigaciones Científicas

⁴Sección Inmunogenética, Laboratorio de Fisiopatología, Centro de Medicina Experimental, Instituto Venezolano de Investigaciones Científicas

⁵Unidad de Tórax, Hospital Dr. José Ignacio Baldó. El Algodonal, Caracas

⁶Unidad de Tórax, Hospital Dr. José Ignacio Baldó. El Algodonal, Caracas

Correspondencia: Instituto de Medicina Tropical - Facultad de Medicina - Universidad Central de Venezuela.

Consignado el 10 de Abril del 2013 a la Revista Vitae Academia Biomédica Digital.

RESUMEN

Introducción: La Interleuquina 10 (IL-10) se ha implicado en la inmunidad protectora y la fisiopatología de la tuberculosis (TB). Basándonos en la hipótesis de que los genes que regulan la IL-10 pueden influir en la susceptibilidad de la TB, investigamos los polimorfismos (-1082 A/G, -819 C/T y "-592A/C) del gen IL-10 en la población venezolana. Métodos: Se obtuvo ADN genómico de leucocitos de sangre periférica en 118 individuos venezolanos no relacionados (TB pulmonar = 50, controles sanos = 68). Las regiones de los polimorfismos del gen de IL-10 fueron amplificadas por PCR-SSP, utilizando un kit comercial. Las frecuencias genotípicas se determinaron por conteo directo. Resultados: El polimorfismo -1082 A/A del gen IL10 ($p < 0.05$) estuvo asociado positivamente con TB, mientras que se identificó una asociación protectora para el polimorfismo -1082 A/G ($p < 0.01$). La comparación de las frecuencias genotípicas para los polimorfismos -819 C/T y "-592 A/C no revelaron diferencias significativas entre los pacientes con tuberculosis y los controles ($p > 0.05$). Conclusión: Nuestros resultados sugieren que el polimorfismo -1082 del gen IL-10 puede desempeñar un rol en la susceptibilidad o resistencia a la TB en la población Venezolana.

PALABRAS CLAVE: IL 10, Polimorfismos, Venezuela, Tuberculosis Pulmonar

VARIABILITY OF THE IL-10 GENE AND SUSCEPTIBILITY TO PULMONARY TUBERCULOSIS IN VENEZUELAN PATIENTS

SUMMARY

Background: Interleukin 10 (IL-10) has been implicated in the protective immunity and pathophysiology of tuberculosis (TB). Based on the hypothesis that genes which regulate IL-10 may influence TB susceptibility, we investigated IL-10 (1082 A/G, -819 C/T and "-592 A/C) polymorphisms in Venezuelan population. Methods: Genomic DNA from peripheral blood leukocytes was obtained from 118 unrelated Venezuelan individuals (Pulmonary TB=50, healthy controls = 68). The regions of the IL-10 gene polymorphisms were amplified by PCR-SSP, using a commercial kit. Genotype frequencies were determined by direct counting. Results: IL10 -1082 A/A ($p < 0.05$) were positively associated with TB, while protective association was identified for IL-10 -1082 A/G ($p < 0.05$). Conclusion: Our findings suggest that -1082 IL-10 gene polymorphisms may play a role in susceptibility or resistance to TB in Venezuelan population.

KEY WORDS: Pulmonary Tuberculosis, Polymorphisms, IL-10, Venezuelan population

VARIABILIDAD DEL GEN IL-10 Y SUSCEPTIBILIDAD A LA TUBERCULOSIS PULMONAR EN PACIENTES VENEZOLANOS

INTRODUCCIÓN

La tuberculosis (TB) es una enfermedad infecciosa que en la actualidad continúa siendo un importante problema de salud pública, a pesar de que se conocen tratamientos con capacidad de curar a una gran mayoría de los enfermos desde hace más de 50 años. Por

razones aún no bien dilucidadas, solo un 30% de los individuos expuestos al *Mycobacterium tuberculosis* (*M tuberculosis*) están infectados, de los cuales un 95% permanece asintomático y solo un 5 % desarrolla la enfermedad en el transcurso de sus vidas⁽¹⁾. En Venezuela, el Sistema de Registro de Datos e Información del Programa Nacional Integrado de Control de la Tuberculosis reportó en el año 2009 una tasa de incidencia de 21,89 casos, y de 68,94 casos por 100.000 habitantes en el Distrito Capital⁽²⁾.

Múltiples evidencias soportan que grupos poblacionales y raciales poseen variaciones en su resistencia o susceptibilidad a la TB, aunque se hace bastante difícil conducir estudios genéticos en enfermedades infecciosas por su naturaleza multifactorial que incluye al hospedero, patógeno y variables ambientales, en diferentes proporciones para cada enfermedad y para cada sujeto estudiado. Estudios casos-controles han identificado asociaciones entre el desarrollo de la enfermedad y algunos genes involucrados en la respuesta inmune a *M tuberculosis*⁽³⁻⁶⁾.

El papel de las citoquinas en la inmunidad celular desarrollada en contra del *M tuberculosis* está bien establecido⁽⁷⁾. La interleuquina 10 (IL-10) es considerada una citoquina antiinflamatoria producida por los macrófagos y células T durante la infección, favorece la respuesta Th-1 a *M tuberculosis*, reactiva la tuberculosis crónica en ratones y reduce la apoptosis inducida por micobacterias en macrófagos murinos y humanos⁽⁸⁾, inhibe directamente la respuesta de las células T CD4+ e indirectamente suprime la función de las células presentadoras de antígeno infectadas por *M. tuberculosis*^(9,10), se ha descrito además que la IL-10 convierte la célula dendrítica humana en células similares a macrófagos con una incrementada actividad antimicobacterial⁽¹¹⁾.

El gen de la IL-10 está localizado en el cromosoma 1, en la posición 1q31-1q32⁽¹²⁾. Se han reportado en la literatura 49 polimorfismos: 46 son polimorfismos de nucleótido único o *Single Nucleotide Polymorphisms* (SNP), dos son microsatélites y uno es una pequeña delección. Del total de polimorfismos, 28 son de la región promotora y 20 no codifican ni regulan. Se ha descrito asociación de los haplotipos configurados por los alelos en las posiciones -1082, -819 y -592 con los niveles de expresión de IL-10⁽¹³⁻¹⁴⁾ y un importante número de estudios de asociación han implicado a estos SNP con la susceptibilidad y/o resistencia al desarrollo de tuberculosis^(8,10,15-21).

Los resultados de los estudios realizados en diferentes grupos étnicos han generado controversia y despertado el interés por conocer si la asociación de estos SNP con la resistencia y/o susceptibilidad a la tuberculosis está también presente en población venezolana, por tal motivo, el objetivo de la presente investigación fue evaluar el papel de los SNP -1082 A/G, -819 C/T y -592 A/C del gen IL-10 en la susceptibilidad a desarrollar TB pulmonar.

MATERIALES Y MÉTODOS

Se incluyeron 85 individuos venezolanos de tercera generación (padres y abuelos venezolanos), no relacionados, mayores de 18 años, sin consideración de sexo, los cuales se agruparon en:

Grupo 1 (Pacientes con tuberculosis pulmonar): individuos con diagnóstico clínico de tuberculosis pulmonar, diagnosticados en el Servicio de Neumología del Hospital José Ignacio Baldó del Algodonal. (Consulta externa y hospitalización).

Grupo 2 (Controles): individuos sanos seleccionados del personal del Servicio de Neumología del Hospital José Ignacio Baldó del Algodonal, quienes han trabajado por más de 10 años en el servicio expuestos a infección por *M tuberculosis* (prueba de tuberculina o PPD positiva) y sin ningún tipo de manifestación clínica de la enfermedad al momento de la toma de muestra de sangre.

Criterios de Exclusión: Individuos con comorbilidades: diabetes, cáncer, SIDA, nefropatías, hepatopatías y condiciones asociadas: embarazo, alcoholismo o drogadicción.

Previo a la recolección de las muestras del grupo de pacientes y controles, se les solicitó la firma de un consentimiento informado aprobado por el Comité de Bioética del IVIC y del Hospital José Ignacio Baldó del Algodonal de Caracas.

Criterios para el diagnóstico de TB

Los pacientes fueron seleccionados de acuerdo a los criterios diagnósticos de la Norma Nacional Venezolana del Programa Nacional Integrado de Control de la Tuberculosis vigente, con exámenes de dos Baciloskopias (BK) positivo, síntomas clínicos de TB y radiografías de tórax consistente con enfermedad activa (22,23).

Prueba de tuberculina en piel (PTP)

La prueba intradérmica de tuberculina (PT) fue realizada utilizando una Unidad de Tuberculina (0,1 ml) de Derivado Proteico Purificado (PPD) RT23 y las induraciones se midieron después 48 horas. Una medida ≥ 10 mm se consideró como positiva.

Genotipificación

El ADN genómico fue extraído de las células blancas de sangre periférica siguiendo el protocolo descrito por Bunce⁽²⁴⁾. La genotipificación de las variantes -1082 A/G, -819 C/T y "592 A/C se realizó a través de la reacción en cadena de polimerasa con iniciadores de secuencia específica (PCR-SSP), utilizando el estuche comercial Cytokine Genotyping Tray (One Lambda, Inc. Canoga Park, CA). Los productos amplificados fueron verificados en geles de agarosa al 2.5%

Análisis Estadístico

El estudio comparativo entre los pacientes infectados con *M. tuberculosis* e individuos sanos se realizó en base al cálculo de las frecuencias genotípicas. Las diferencias entre grupos se

estimó por la prueba de χ^2 Mantel-Haenszel y la intensidad de la asociación se calculó como Odds Ratio (OR). Los valores de (p) se corrigieron multiplicándolos por el número de comparaciones hechas (corrección de Bonferroni) y se consideraron significativas cuando el valor de $p < 0.05$.

RESULTADOS

El análisis realizado permitió establecer las frecuencias genotípicas de las variantes polimórficas del gen en ambos grupos. Para investigar la posible influencia de los polimorfismos en la tuberculosis pulmonar, se realizaron comparaciones de las frecuencias genotípicas entre los pacientes y los individuos sanos. En las tablas 1-3 se muestra la frecuencia de los genotipos -1082 A/G, -819 C/T y -592 A/C (gen IL-10) en individuos sanos y pacientes.

Tabla 1.- Frecuencias genotípicas de IL-10: -1082 en pacientes con TB pulmonar y controles sanos

Genotipo	TB (n=50)	Frecuencia %	Control (n=68)	Frecuencia %	OR (IC 95%)	p	pc
AA	22	43.1	17	25	2.35 (1.0775-5.572)	0.015	0.045
AC	25	49	50	73.5	0.36 (0.1661-0.7798)	0.004	0.012
GC	3	5.9	1	1.5	4.27 (0.431-42.3814)	ns	ns
Total	50	100	68	100			

ns: no significativo

Tabla 2.- Frecuencias genotípicas de IL-10: -819 en pacientes con TB pulmonar y controles sanos

Genotipo	TB (n=50)	Frecuencia %	Control (n=68)	Frecuencia %	OR (IC 95%)	P	pc

CC	13	25	20	29.4	0.84	ns	ns
						(0.3761-1.9133)	
CT	32	65	41	60.3	1.17	ns	ns
						(0.5504-2.4897)	
TT	5	10	7	10.3	0.96	ns	ns
						(0.2885-3.2485)	
Total	50	100	68	100			

Tabla 3.- Frecuencias genotípicas de IL-10: -592 en pacientes con TB pulmonar y controles sanos

Genotipo	TB (n=50)	Frecuencia %	Control (n=68)	Frecuencia %	OR (IC 95%)	p	pc
AA	5	9.5	8	11.8	0.83	ns	ns
						(0.2554-2.7180)	
AC	32	61.5	41	60.3	1.17	ns	ns
						(0.5504-2.4897)	
CC	13	25	19	27.9	0.90	ns	ns
						(0.3172-2.0666)	
Total	50	100	68	100			

-7082: Al comparar las frecuencias genotípicas entre ambos grupos, observamos una frecuencia significativamente incrementada del genotipo AA (44 vs 25%, respectivamente; OR = 2.35; IC95%: 1.0773-5.1572; $p=0.015$; $pc=0.045$) en los pacientes con respecto a los individuos sanos y una frecuencia disminuida del genotipo A/G en los pacientes con respecto a los individuos sanos (50 vs 73.53%, respectivamente; OR = 0.36; IC95%: 0.1661-0.7798; $p = 0.004$; $pc = 0.012$).

Sugiriendo que los individuos con el genotipo A/A tienen mayor riesgo de desarrollar TB, a diferencia del genotipo A/G, cuya presencia protege contra el desarrollo de la enfermedad.

-819 C/T: El genotipo heterocigoto CT fue el más frecuente tanto en pacientes como en individuos sanos, pero al comparar las frecuencias genotípicas no se encontraron diferencias estadísticamente significativas ($p > 0.05$).

-592 A/C: En individuos sanos y pacientes, el genotipo encontrado con mayor frecuencia fue el heterocigoto AC, sin embargo, no se encontraron diferencias significativas al comparar las frecuencias genotípicas ($p > 0.05$).

DISCUSIÓN

Las citoquinas juegan un importante papel orquestando la respuesta immune, la cual es activada como una red de citoquinas proinflamatorias y sobre-reguladoras derivadas de las células T y macrófagos, determinando la evolución de la enfermedad tuberculosa.

Los estudios de susceptibilidad genética a la TB han sido contradictorios en lo que respecta a los genes de citoquinas. Algunas investigaciones han observado mayor frecuencia del genotipo -1082 GG de IL-10 en pacientes con tuberculosis pulmonar al compararlos con los controles sanos⁽¹⁵⁻¹⁶⁾ a diferencia de nuestro estudio donde el genotipo encontrado con mayor frecuencia en los enfermos fue el AA. Henao y colaboradores, en una población colombiana, evaluaron asociaciones genotípicas y haplotípicas de genes de citoquinas en diferentes formas clínicas de la enfermedad (TB pleural, miliar y pulmonar), encontrando que el genotipo IL-10 -1082 A/A estaba asociado a TB pleural⁽⁷⁾.

En población española Lopez-Maderuelo y colaboradores demostraron que el SNP en la posición -1082 (región promotora del gen de la IL-10) no estuvo asociado con la susceptibilidad a la enfermedad⁽⁹⁾, en concordancia a lo descrito por Bellamy y colaboradores⁽¹⁷⁾ en estudios realizados en Gambia, y Shin y colaboradores en Corea⁽¹⁸⁾, quienes no encontraron asociaciones significantes entre este SNP y susceptibilidad o resistencia a TB.

El efecto genético de IL 10 (-1082 A/G) continúa siendo motivo de controversia⁽¹⁵⁾, en nuestra serie de pacientes se encontró una frecuencia significativamente incrementada ($p < 0.01$) del genotipo AG en el grupo control, lo que sugiere que dicho genotipo confiere protección al desarrollo de la enfermedad tuberculosa en población venezolana, a diferencia de lo reportado por Ates y colaboradores⁽¹⁶⁾ quienes hallaron asociación significante entre TB y presencia del alelo -1082 G y por Ben-Selma⁽¹⁹⁾ quien encontró que el genotipo -1082 A/G estuvo asociado significativamente con un riesgo incrementado al desarrollo de TB y el -1082 A/A con resistencia a la enfermedad; y por Delgado y colaboradores⁽⁵⁾ en Cambodia quienes también reportaron asociación del genotipo AG con susceptibilidad a la enfermedad. Una asociación del alelo A con TB fue observada en población Italiana (Siciliana)⁽²⁰⁾.

En la investigación de Shin y colaboradores que incluyó 459 pacientes Coreanos, se demostró que el polimorfismo (*IL-10* -592 A/C) estuvo asociado significativamente con una disminución en el riesgo presentar enfermedad tuberculosa⁽¹⁸⁾, en nuestro estudio no se observaron diferencias entre las frecuencias genotípicas de los pacientes tuberculosos y los controles sanos del SNP *IL-10*: -592, ni en el SNP *IL-10*: -819, similar a lo descrito por Ates en Turquía⁽¹⁶⁾ y Zhin en China⁽²¹⁾.

Las diferencias observadas en los resultados de las investigaciones realizadas en distintos países han sido atribuidas a los diseños de los estudios, a los criterios de selección de pacientes y con una mayor consistencia a las *Additionaly, the association observed in the later studies may be explained on the basis of linkage disequilibrium that exists between the TNF genes and HLA* variaciones técnicas que persisten en las diferentes poblaciones⁽²⁵⁾.

La principal limitación de este estudio fue el tamaño de la muestra, que consideramos debe ampliarse en investigaciones futuras; sin embargo, podemos concluir con esta investigación preliminar, la primera realizada en nuestro país, que el genotipo *IL-10* -1082 A/A, se asoció significativamente a una mayor susceptibilidad a la enfermedad tuberculosa y el genotipo AG a una disminución de la susceptibilidad a la TB, siendo estos SNP candidatos a ser estudiados a mayor escala en la población venezolana.

REFERENCIAS

1. Caminero JA. Patogenia de la tuberculosis. Infección y enfermedad. En: Guía de la Tuberculosis para Médicos Especialistas. 1ra ed. París: Unión Internacional Contra la Tuberculosis y Enfermedades Respiratorias; 2003.p.57.
2. Dirección General de Programas, Viceministerio de Salud, Ministerio del Poder Popular para la Salud. *?Informe del Programa Nacional Integrado de Control de la Tuberculosis ? A?o 2009?*. Caracas: MPPS; 2009
3. Haldane JBS. Disease and evolution. *Ricerca Scientifica Supplement* 1949; 19: 68?76.
4. Li H-T, Zhang T-T, Zhou Y-Q, Huang Q-H, Huang J. *SLC11A1* (formerly *NRAMP1*) gene polymorphisms and tuberculosis susceptibility: a meta-analysis. *Int J Tuberc Lung Dis* 2006; 10(1): 3-12.
5. Lewis SJ, Baker I, Davey Smith G. Meta-analysis of vitamin D receptor polymorphisms and pulmonary tuberculosis risk. *Int J Tuberc Lung Dis* 2005; 9(10): 1174-1177.
6. Delgado JC, Baena A, Thim S, Goldfeld AE. Ethnic-specific genetic associations with pulmonary tuberculosis. *J Infect Dis* 2002; (10): 1463?1468.
7. Bellamy R. Genetic susceptibility to tuberculosis. *Clin Chest Med*. 2005; 26(2): 233-246.
8. [Henao MI, Montes C, Paris SC, Garcia LF](#). Cytokine gene polymorphisms in Colombian

patients with different clinical presentations of tuberculosis. *Tuberculosis (Edinb)*. 2006; 86(1):11-19.

9. Raja A. Immunology of Tuberculosis. *Indian J Med Res*, 2004; 4: 212-32.

10. Lpez-Maderuelo D, Arnalich F, Serantes R, Gonzlez A, Codoceo R, Madero R, et al. Interferon-gamma, and Interleukin-10 Gene Polymorphisms in Pulmonary Tuberculosis. *Am J Respir Crit Care Med* 2003; 167(2): 970-975.

11. [Frtsch D, Réllinghoff M](#), Stenger S. IL-10 converts human dendritic cells into macrophage-like cells with increased antibacterial activity against virulent *Mycobacterium tuberculosis*. *J Immunol* 2000; 165 (2): 978-987.

12. Eskdale J, Kube D, Tesch H, Gallagher G. Mapping of the human IL-10 gene and further characterization of the 5' flanking sequence. *Immunogenetics*. 1997; 46 (2):120-128.

13. Suarez A, Castro P, Alonso R, Gutierrez C. Interindividual variations in constitutive Interleukin-10 messenger RNA and protein levels and their association with genetics polymorphisms. *Transplantation*, 2003;75 (5):711-717.

14. Turner D, Williams D, Sankaran D, Lazarus M, Sinnott P, Hutchinson I. An investigation of polymorphism in the Interleukin-10 gene promoter. *Eur J Immunogenet*. 1997; 24 (1):1-8.

15. Oral HB, Budak F, Uzaslan EK, Basterk B, Bekar A, Akalin H, et al. Interleukin-10 (IL-10) gene polymorphism as a potential host susceptibility factor in tuberculosis. *Cytokine*. 2006; 35(3-4):143-147.

16. [Ates O, Musellim B, Ongen G, Topal-Sarikaya A](#). Interleukin-10 and tumor necrosis factor-alpha gene polymorphisms in tuberculosis. *J Clin Immunol*. 2008; 28(3):232-236.

17. Bellamy R. Susceptibility to mycobacterial infections: the importance of host genetics. *Genes Immun*. 2003;4(1):4?11

18. Shin H, Park B, Kim L, Cheong H, Lee I, Park SK, et al. Common interleukin 10 polymorphisms associated with decreased risk of tuberculosis. *Exp Mol Med* 2005; 37(2): 128-312.

19. Ben-Selma W, Harizi H, Boukadida J. Association of TNF- α and IL-10 polymorphisms with tuberculosis in Tunisian populations. *Microbes Infect*. 2011;13(10):837-843.

20. Scola L, Crivello A, Marino V, Gioia V, Serauto A, et al. IL-10 and TNF-alpha polymorphisms in a sample of Sicilian patients affected by tuberculosis: implication for ageing and life span expectancy. *Mech Ageing Dev*. 2003; 124(4):569-572.

21. [Zhang J, Chen Y, Nie XB, Wu WH, Zhang H, Zhang M](#) et al. Interleukin-10 polymorphisms and tuberculosis susceptibility: a meta-analysis. *Int J Tuberc Lung Dis*. 2011;15(5):594-601

22. Norma del Programa Nacional Integrado de Control de la Tuberculosis. MPPS. 2005.

23. Gonzlez A, Garcí JR, Lobo O. Tuberculosis. 2da ed. Caracas: DISINLIMED; 2002.

24. Bunce M. PCR-SSP typing. En: Lidwell JL, Navarrete C, eds. *Histocompatibility testing*. London: Imperial College Press; 2000: p. 167-176
25. Stein C. Genetic Epidemiology of Tuberculosis Susceptibility: Impact of Study Design PLoS Pathog. 2011; 7(1): e1001189.