



ESTUDIO DE FRECUENCIA GENOTÍPICA DE SOD-Mn Ala9Val MARCADORES DE INFLAMACION Y ESTRÉS OXIDATIVO EN CHAGAS

JULIA MARINA CAFFARATTI¹ ; Susana Lioi¹ ; Gabriela Gerrard¹ ; Romina Diviani¹ ; Maria Jose Ceruti¹ ; Juan Beloscar² ; Mabel D'Arrigo¹

1- Área Química Analítica Clínica. Departamento de Bioquímica Clínica. Facultad de Ciencias Bioquímicas y Farmacéuticas. UNR. Rosario. Argentina

2- Carrera de Cardiología. Facultad de Ciencias Médicas. UNR. Rosario. Argentina

Introducción

- En la Miocardiopatía Chagásica Crónica (MCC), la inflamación progresiva podría modificar el estado antioxidante celular.
- Los factores fisiopatológicos que controlan la formación y la perpetuación de la inflamación cardíaca aún no fueron totalmente aclarados.
- El curso de la enfermedad dependería de:
 - la carga y cepa parasitaria.
 - factores genéticos.
 - estado inmunológico del huésped entre otros.

Introducción

- Existen en la actualidad teorías inmunológicas y no inmunológicas que explican la MCC, siendo la presencia y persistencia de *Trypanosoma cruzi* un hecho necesario. **Sin embargo el mecanismo exacto por el cual el parásito causa daño cardíaco en la fase crónica es desconocido.**
- El incremento en la producción de especies altamente oxidantes que contribuyen con la destrucción del parasito estaría relacionado con el daño al miocardio. Esto se ve reflejado por el aumento plasmático de marcadores de estrés oxidativo.
- Se evidencia un estado celular en el cual existe un desbalance entre pro-oxidantes y antioxidantes.
- La infección por *T. cruzi* activa la síntesis de citoquinas proinflamatorias: INF- γ y FNT- α que estimula a los macrófagos para la inducción de agentes oxidantes y citotóxicos. **Estudios indican que reacciones inflamatorias en el corazón se relacionan con mayor producción de citoquinas que inducirían una mayor generación de especies reactivas (ROS/RNS).**

Objetivo

Se propuso realizar un estudio descriptivo de:

- Polimorfismo de superóxido dismutasa dependiente de Mn (SOD-Mn Ala9Val)
- Marcadores de estrés oxidativo:
 - ✓ Peroxidación lipídica a través el ensayo de Sustancias Reactivas del Acido Tiobarbitúrico (TBARs).
 - ✓ Actividad enzimática de superóxido dismutasa (SOD).
 - ✓ Factor de necrosis tumoral alfa (TNF α) como marcador de inflamación.

Materiales y Métodos

Se analizaron muestras de sangre de individuos:

- Chagásicos sin MCC (ECsinMCC; n=40)
- Chagásicos con MCC (MCC; n=45)
- Controles normales (CN; n=60)

Se les realizó a todos los pacientes:

- Examen cardiovascular
- Electrocardiograma
- Radiografía de tórax
- Exámenes complementarios

Materiales y Métodos

✓ **Criterios de inclusión:**

- Pacientes chagásicos crónicos confirmados por serología convencional con diferente grado de daño cardiológico evaluados por la cátedra de cardiología del Hospital Provincial del Centenario de Rosario (HPC).
- Pacientes chagásicos crónicos confirmados por serología convencional sin daño cardiológico evaluados por la cátedra de cardiología del HPC.
- Individuos controles sanos que asisten al consultorio externo del HPC. Rosario.
- Los pacientes y controles firmaron previamente el consentimiento para participar en el proyecto.

✓ **Criterios de exclusión:**

- Pacientes que no presentaron el diagnóstico requerido.
- Pacientes con enfermedades sistémica asociada de carácter metabólico, inmunológico, oncológico y/o infeccioso.
- Pacientes con tratamientos con inmunomoduladores o inmunosupresores.
- Pacientes en donde no fue posible la obtención de la muestra para las determinaciones.
- Pacientes e individuos sanos que se niegan a firmar el consentimiento para participar en el proyecto.

Materiales y Métodos

tBARS : peroxidación lipídica mediante el ensayo SRAT (Sustancias Reactivas al Ácido Tiobarbitúrico, tBARS)

Material: suero

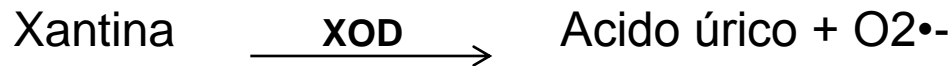
- Los radicales libres (RL) derivados de oxígeno molecular son compuestos altamente reactivos. Pueden reaccionar con moléculas biológicas tales como proteínas, lípidos y ácidos nucleicos.
- Las estimaciones del estrés oxidativo in vivo son necesariamente indirectas, dado la naturaleza efímera de los radicales libres.
- Los peróxidos lipídicos son los productos del daño químico producido por los RL a los ácidos grasos poliinsaturados de las membranas biológicas siendo un mecanismo importante de lesión celular.
- Los peróxidos lipídicos son inestables y se descomponen formando entre otros compuestos malondialdehído (MDA) que es el analito más utilizado con el fin de estimar los efectos del estrés oxidativo sobre los tejidos.
- La prueba de los TBARs cuantifica un cromógeno producido por la reacción del Ácido Tiobarbitúrico con el MDA por medio de un análisis espectrofotométrico.

Materiales y Métodos

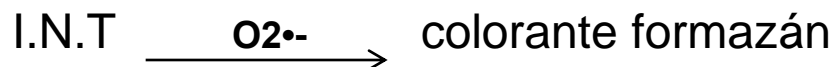
Actividad SOD:

Material: hemolizado de GR

- La función de la superóxido dismutasa (SOD) es acelerar la dismutación del radical tóxico superóxido ($O_2^{\bullet-}$) en peróxido de hidrógeno y oxígeno molecular.
- Este método emplea Xantina y Xantin oxidasa (XOD) para formar radicales superóxido que reaccionan con INT (cloruro de 2-(4-yodofenil)-3-(4-nitrofenol)-5-fenil tetrazolio) para formar un formazán rojo que se determina espectrofotométricamente. Se mide la actividad de la superóxido dismutasa por el grado de inhibición de esta reacción.
- Una unidad de SOD es la que causa un 50% de inhibición del valor de reducción de INT bajo las condiciones del análisis (Kits Ransel Labs)



↑



o



Materiales y Métodos

TNF α :

Material: suero

- El TNF- α se ha encontrado en el corazón de animales infectados experimentalmente así como en células de infiltrado inflamatorio de miocardiopatía chagásica humana.
- La cuantificación del TNF- α se realiza mediante un ELISA no competitivo que utiliza un anticuerpo monoclonal específico. (HUMAN TNF ELISA -BD OptEIA)



Materiales y Métodos

Polimorfismo de SOD-Mn :

- La Mn-SOD es una de las principales responsables de la detoxificación de especies reactivas de oxígeno en mitocondria.
- En el gen de la Mn-SOD la sustitución T → C en el nucleótido 47 resulta en el cambio Val → Ala en la posición 9 (polimorfismo Ala-9-Val) alterando la estructura secundaria de la proteína y reduciendo la eficiencia del transporte de la misma hacia el interior de la mitocondria.
- Caracterización molecular:
 - Se utilizó sangre periférica extraída en forma aleatoria de individuos que participaron previo consentimiento.
 - Se extrajo el DNA de leucocitos sanguíneos (DNA Purification Kit Wizard Genomic. Promega)
 - Se realizó PCR-RFLP utilizando Hae III como enzima de restricción.

Resultados

	ECsinMCC	MCC	CN
TBARs (nmol/ml)	3.36 ± 1.20	4.24 ± 1.52	2.33 ± 0.60
SOD (USOD/gHb)	2610 ± 190	3500 ± 750	890 ± 310
TNFα (pg/ml)	26.1 ± 6.8	33.3 ± 7.2	7.7 ± 2.4

Tabla I. Valores de TBARs, SOD, y TNF α .

Los resultados se muestran como Media (DE)

Resultados

- Para el estudio estadístico se realizó análisis de variancia a un criterio de clasificación para cada enzima y se aplicó Kruskal Wallis.
- El nivel de significancia se estableció en $p < 0,05$.
- Los resultados muestran para TBARS, SOD, y FNT α diferencias significativas ($p < 0.01$) entre MCC, ECsinMCC y CN.

Resultados

FG SOD-Mn (IC 95 %)	ECsinMCC	MCC	CN
Ala-Ala	0.360 (0.089-0.631)	0.330 (0.10-0.48)	0.850 (0.259-1.021)
Ala-Val	0.460 (0.178-0.742)	0.300 (0.10-0.50)	0.150 (0.087-0.383)
Val-Val	0.180 (0.000-0.397)	0.370 (0.140-0.560)	0.000 (0.000-0.000)

Tabla II. FG de SOD-MnAla9Val

Resultados

- Para comparar las frecuencias genotípicas (FG) en los grupos estudiados, se realizó el ensayo de hipótesis de una proporción bajo teoría normal con un intervalo de confianza del 95% (IC 95%).
- Las FG en los grupos estudiados se compararon con la Test exacto de Fisher.
- Los resultados evidencian que existen diferencias significativas entre MCC y los demás grupos estudiados en la mutación Val-Val de SOD-Mn ($p= 0.00067$, $pc = 0.00134$).

Conclusiones

- ✓ Es conocido que la actividad de Mn-SOD estaría más afectada por la variante que contiene Val.
- ✓ En la MCC se observa aumento de FG de Val-Val, de actividad de biomarcadores de estrés oxidativo y de inflamación en MCC.
- ✓ Deberían realizarse nuevas investigaciones con mayor cantidad de pacientes para aclarar estos aspectos fisiopatológicos en la MCC.
- ✓ La determinación de biomarcadores estudiados sería potencialmente útil en el diseño de modelos predictivos para identificar pacientes chagásicos con riesgo de desarrollar complicaciones clínicas.
- ✓ La comprensión de eventos involucrados en el estrés oxidativo puede contribuir con el desarrollo de nuevas estrategias terapéuticas que resulten en el control del parásito y de la inflamación que lleva a la MCC.