

Capítulo 1.

Evaluación del polimorfismo -592 C/A en el gen que codifica por interlucina 10 (IL-10) en pacientes con diagnóstico de sepsis bacteriana

Romel Fabián Gómez. MsC¹

<https://orcid.org/0000-0002-9529-9599>

Alfonsina del Cristo Martínez. MsC²

<https://orcid.org/0000-0002-8205-5747>

Mónica Chávez Vivas. Ph.D³

<https://orcid.org/0000-0001-9996-3744>

RESUMEN

Introducción

Las altas tasas de mortalidad que se presentan alrededor de la sepsis ha hecho necesario buscar nuevos marcadores para abordar al paciente más oportunamente. El objetivo de este trabajo de grado fue establecer la asociación del polimorfismo -592C/A del gen IL-10 y el desarrollo de sepsis bacteriana y choque séptico en pacientes que se encuentran en la Unidad de cuidados Intensivos (UCI) de la Clínica Versalles de la ciudad de Cali durante el año 2018.

Materiales y métodos

Un total de 62 pacientes con diagnóstico de sepsis o choque séptico fueron incluidos en el estudio. Se obtuvo la sangre periférica

1. Universidad Libre - Seccional Cali
Cali, Colombia

✉ rofagom@gmail.com

3. Universidad Santiago de Cali
Cali, Colombia

✉ monica.chavez02@usc.edu.co

2. Universidad Santiago de Cali
Cali, Colombia

✉ alfonsina.matinez00@usc.edu.co

y se extrajo el ADN y se realizó la amplificación del gen que codifica para la IL-10 para detectar la variante polimórfica -592C/A mediante la aplicación de la técnica de ensayo de amplificación del cebador específico de secuencia por PCR (PCR-SSP).

Resultados

Los pacientes estudiados tenían un promedio de 53 años de edad, con una estancia hospitalaria de 7 días, el 59,7% eran varones. El 69,4% de los pacientes presentó sepsis y el 30,6% choque séptico. El 16,1% de pacientes falleció. El pulmón (40,3%) y la hipertensión arterial (43,5%) y los procesos hematológicos (17,7%) fueron el foco séptico, la comorbilidad y la disfunción orgánica más reportadas. Las bacterias Gram negativas se detectaron en forma significativa (59,7%; $p < 0,05$). El análisis de la posición IL-10-592C/A del gen IL-10 evidenció que los pacientes que desarrollaron sepsis presentaron con más frecuencia el genotipo homocigoto AA, el cual se relacionó en forma significativa con altos niveles de IL-10 al momento del ingreso a la UCI ($p = 0,001$) y en el 70,6% de los pacientes continuaron los niveles de la IL-10 altos durante las primeras 48 horas del ingreso a la UCI

Conclusión

El análisis de la posición IL-10-592C/A del gen IL-10 evidenció relación significativa con altos niveles plasmáticos de la IL-10.

Palabras Clave

Interleucina 10, polimorfismo, -592C/A IL-10, sepsis, choque séptico.

Abstract

Introduction. High mortality rates that occur around sepsis have made it necessary to search for new markers to approach the pa-

tient more promptly. The objective of this degree work was to establish the association of the -592C / A polymorphism of the IL-10 gene and the development of bacterial sepsis and septic shock in patients who are in the Intensive Care Unit (ICU) of the Versalles Clinic in the city of Cali during the year 2018.

Materials and methods

A total of 62 patients with a diagnosis of sepsis or septic shock were included in the study. Peripheral blood was obtained and DNA was extracted and the gene encoding IL-10 was amplified to detect the -592C / A polymorphic variant by applying the sequence-specific primer amplification assay by PCR (PCR-SSP).

Results

The patients had an average of 53 years and 7 days of hospital stay, 59.7% were men. 69.4% of the patients presented sepsis and 30.6% septic shock. 16.1% of patients died. The lung (40.3%) and arterial hypertension (43.5%) and hematological processes (17.7%) were the most reported septic focus, comorbidity and organ dysfunction. Gram negative bacteria were detected significantly (59.7%; $p < 0.05$). The analysis of the IL-10-592C / A position of the IL-10 gene showed that patients who developed sepsis more frequently presented the homozygous AA genotype, which was significantly related to high levels of IL-10 at the time of admission to the ICU ($p = 0.001$) and in 70.6% of the patients the levels of IL-10 continued to be high during the first 48 hours after admission to the ICU.

Conclusion

Analysis of the IL-10-592C / A position of the IL-10 gene showed a significant relationship with high plasma levels of IL-10.

Keywords

Interleukin 10, polymorphism, -592C/A IL-10, sepsis, septic shock.

INTRODUCCIÓN

La interlucina-10 (IL-10) es una citocina secretada principalmente por los macrófagos, eosinófilos, linfocitos T y B. La principal función de esta citocina es limitar la respuesta inflamatoria. Uno de los factores que influyen en su producción son las infecciones (Hjuler et al, 2008), y se ha visto que juega un papel relevante en la patogénesis de la sepsis (1). En este sentido, se ha relacionado la producción excesiva de la Il-10 como inductor de inmunosupresión en sepsis bacteriana e incremento de la mortalidad (2).

La producción de esta citocina varía entre individuos y estaría influenciada por las características genéticas, entre ellas, el cambio de un solo nucleótido en el gen que codifica la IL-10, lo que genera un polimorfismo conocido comúnmente como SNP. En la región promotora del gen *Il-10* se han detectado tres SNP (-1082, -819, y -592) (3) que se han relacionado con los cambios en los niveles de la IL-10 y en la susceptibilidad de la sepsis (4).

El polimorfismo generado por el cambio de adenina por guanina en la posición -1082 se relaciona con la evolución de la sepsis (3, 8). El alelo -1082A se relaciona con susceptibilidad al desarrollo de sepsis; siendo el genotipo AA relacionado con aumento en la producción de la IL-10 y por lo tanto con inmunosupresión inducida a las infecciones. El genotipo -1082G/G se ha asociado con menor mortalidad en pacientes que desarrollan sepsis (3). Sin embargo, resultados contradictorios se han encontrado en

otras investigaciones, el alelo -1082A se asocia significativamente con menor producción de IL-10 inducida debido al efecto del lipopolisacárido (LPS) de las bacterias Gram negativas y el alelo -1082G se relaciona con una mayor producción de IL-10 y mayor mortalidad en la sepsis grave (5).

En un metaanálisis se encontró que los polimorfismos de IL-10 están asociados con la susceptibilidad a la sepsis en poblaciones caucásicas y asiáticas (6). Además, del riesgo de shock séptico en este estudio posiblemente debido al aumento de las concentraciones plasmáticas de IL-10 (7).

Es necesario realizar estudios en este polimorfismo para evaluar la precisión de estos datos en diferentes poblaciones, debido a que como lo han establecido algunos investigadores, el diagnóstico temprano de sepsis y el correcto cumplimiento del soporte clínico juegan un papel crítico en la mortalidad (8).

El estudio de los polimorfismos genéticos y el desarrollo de la sepsis ayudan a proporcionar a los clínicos nuevas herramientas para evaluar el pronóstico, para intervenir temprana y agresivamente con el tratamiento a las personas de alto riesgo, y para evitar el uso de terapias con efectos adversos; sin embargo, estos estudios deben ser realizados para cada población en particular. El objetivo de este estudio fue evaluar el polimorfismo -1038 A/G de la región promotora del gen de la IL-10 en pacientes diagnosticados con sepsis en un hospital de la ciudad de Cali.

MATERIALES Y MÉTODO

Este estudio de casos y controles incluyó un total de 62 muestras de pacientes con diagnóstico de sepsis de acuerdo a los parámetros establecidos en el tercer consenso de sepsis (9) y 50 sujetos sanos. Los criterios de inclusión fueron: pacientes que se encuentren en la Unidad de Cuidados Intensivos de la Clínica Versalles con diagnóstico de sepsis bacteriana, mayores de 18 años y que firmaron el consentimiento informado.

Los criterios de exclusión fueron: pacientes infectados por el virus de inmunodeficiencia humana (VIH), con historias clínicas incompletas, que estén recibiendo previamente terapia antimicrobiana, que tengan como antecedentes enfermedades autoinmunes (lupus, espondiloartropatia, psoriasis) o pacientes que estén recibiendo previamente medicamentos inmoduladores (anti-TNF, metrotexate, sulfasalazina) ó con shock refractario post inicio a reanimación con esteroides.

Obtención de las muestras

Para obtener las muestra clínicas de los pacientes con sepsis hospitalizados en la unidad de cuidado intensivo, se tomó una muestra de 5 mL de sangre periférica en un tubo vacutainer (BD, Franklin Lakes, USA) con EDTA como anticoagulante, se centrifugó a 3000 g x 10 minutos y se almacenó a -20 °C, que es la conservación más correcta para los estudios genéticos.

Técnicas genético-moleculares

Extracción del ADN

A partir de 1,5 mL de suero/plasma se realizó la extracción del ADN con el DNeasy Blood & Tissue Kit (Cat No. 69506 QIAGEN) siguiendo el protocolo establecido por la casa comercial. Una vez purificado el ADN se cuantificó su concentración espectrofotométricamente en Nanodrop 2000.

Amplificación del cebador específico de secuencia PCR-SSP

La genotipificación del gen que codifica pro la IL-10 (-1082G / A) se llevó a cabo mediante el empleo del ensayo de amplificación del cebador específico de secuencia por PCR (PCR-SSP), que consiste en emplear los cebadores con el polimorfismo -1038G para el alelo G y -1038A para el alelo A con las condiciones siguientes de amplificación: un ciclo a 95° C durante 5 min seguido de 30 ciclos a 95° C durante 90 s, 60° C por 90 s, 72° C por 1 min y finalmente por 10 min de extensión a 72° C. En los cebadores IL-10 genéricos 5-tct cgg ttt ctt ctc cat cg-3, cebador del alelo G 5-ata ggt ttt gag ggg cat gg-3 y cebador del alelo A 5-ata ggt ttt gagggg cat ga-3- la amplificación se llevó a cabo utilizando el termociclador Bio-Rad.

La electroforesis de los productos de PCR se llevó a cabo en gel de agarosa al 2% y visualizado por Syber Green, la presencia o ausencia de fragmentos se visualizó mediante un transiluminador UV. Un tamaño de producto de 161 pb se consideró una amplificación positiva. Cada una de las mezclas de cebadores contenía un par de cebadores de control que amplificaba una parte del gen de la β -globina humana (fig 1). Se determinaron las frecuencias de alelos y genotipos del gen de la IL-10 (G/A-1082).

Análisis estadístico

Las variables fueron categorizadas y se analizaron mediante la prueba de chi cuadrado empleando el paquete estadístico SPSS vs.23 (Chicago, Inc). Los valores de Odds Ratio (OR) que se muestran en las tablas se obtuvieron utilizando el genotipo ancestral o el alelo como referencia (se muestra como OR = 1). Todas las pruebas fueron de dos colas y el nivel p de significancia se estableció en 0.05.

RESULTADOS

Los pacientes presentaron como promedio de 53 años (DE+19,47), índice SOFA de 89 (DE+0,945) y 7 días (DE+4,87) de estancia hospitalaria. El 59,7% de ellos fueron varones (tabla 1).

Tabla 1. Características sociodemográficas y nivel promedio de la IL-10 determinada en los pacientes con sepsis y choque séptico

	Total (n=62)	Sepsis (n= 43)	Choque séptico (n=19)	P-value
Género M/F	37/25	26/17	11/8	0,849
Edad, promedio ± DS	53.00±19.47	51.93 ±20.258	52.21 ±18.109	0,921
Días de estancia en la UCI, promedio ±DE	7.00±4.874 (2-3)	7.85±3.804 (2-16)	9.53±6.703 (3-33)	0,544
qSOFA ≥ 2 (%)	23 (37.1)	15 (34.9)	8 (42.1)	0,587

IL-10 pg/ mL en el momento de la admisión pg/mL [25th-75th percentiles]	43.00 [26.5- 72.5]	43.00[27-74]	16 [16-48]	0,583
IL-10 48h pg/ mL [25th-75th percentiles]	52 [37.5-83.75]	45 [30-69]	66 [46-90]	0,270

* **p-value estadísticamente significativo $\leq 0,05$**

Fuente: Elaboración propia.

El 69,4% de los pacientes presentó sepsis y el 30,6% choque séptico. El 16,1% de pacientes falleció. El agente etiológico aislado más frecuentemente fue las bacterias Gram negativas (59,7%; $p < 0,05$).

El análisis de la posición -1038 del gen *il-10* evidenció un ligero predominio del alelo A con una frecuencia del 80,6%, frente al alelo G (72,6%).

El genotipo AG fue el más frecuente con un 53,2% de prevalencia, seguido por el genotipo AA con un 27,4% y el genotipo GG con un 17,7%.

Los datos de los SNP IL10 en los pacientes con sepsis se presentan en la Tabla 2. Los pacientes que desarrollaron sepsis presentaron con mas frecuencia el genotipo AA sin representar un valor estadísticamente significativo (76,5%; $p > 0,05$).

En este estudio se determinaron también los niveles plasmáticos de la IL-10 al momento del ingreso a la UCI y en las 48 horas siguientes y se encontró que los pacientes con diagnóstico de sepsis

presentaron un nivel promedio de 43 pg/mL, y en los pacientes que desarrollaron choque séptico, estos niveles se incrementaron a 66pg/mL durante las primeras 48 horas de su ingreso a la UCI.

El grupo control presentó un nivel promedio de 3 pg/ml, valores por encima de estos fueron considerados altos. Los pacientes con altos niveles de IL-10 al momento del ingreso a la UCI representaron el 41,9%, estos niveles se mantuvieron altos en el 48,4% de ellos durante las primeras 48 horas de su ingreso a la UCI.

El genotipo AA se relacionó en forma significativa con altos niveles de IL-10. El 76,5% de los pacientes que tenía el genotipo AA presentó altos niveles de la IL-10 al momento del ingreso a la UCI ($p=0,001$) y en el 70,6% de los casos con este genotipo, los niveles continuaron altos durante las primeras 48 horas de su ingreso a al UCI ($p=0,032$) (Tabla 2).

Table 2. Características de los pacientes con sepsis en relación al genotipo IL-10 -1082.

Característica	Total (n=62)	AG/GG n=45 n(%)	AA n=17 n(%)	OR 95%CI	P-value
GÉNERO					
Mujer	25 (40,3)	20 (44,4)	5 (29,4)	0,521(0,157-1,725)	0,282
Hombre	37 (59,7)	25 (55,6)	12 (70,6)		
SEPSIS	43 (69,4)	30 (66,7)	13 (76,5)	1,625(0,452-5,848)	0,455
CHOQUE SÉPTICO	19 (30,6)	15 (33,3)	4 (23,5)	1,625(0,452-5,848)	0,455
AGENTE ETIOLÓGICO (GRAM NEGATIVOS)	37 (59,7)	24 (53,3)	13 (76,5)	2,844 (0,803-10,070)	0,098

IL-10 ALTA	26 (41,9)	13 (29)	13 (76,5)	8,000 (2,196-29,145)	0,001
IL-10-48HrS ALTA	30 (48,4)	18 (40)	12 (70,6)	3,600 (1,082-11,973)	0,032
Estancia UCI>7 días	37 (59,7)	25 (55,6)	12 (70,6)	1,920 80,580-6,359)	0,282
Fallecidos	10 (16,1)	7 (15,6)	3 (17,6)	1,163 (0,264-5,135)	0,842

Fuente: Elaboración propia.

DISCUSIÓN

En este estudio se investigó una variante polimórfica del gen *il-10* con el desarrollo de sepsis.

Los polimorfismos del gen de *il-10* y la producción de IL-10 influyen en el equilibrio de la respuesta inmune como ya ha sido previamente establecido por otras investigaciones (3, 10). Debido a la importante función en la respuesta inflamatoria durante la sepsis, la naturaleza polimórfica del gen que la codifica puede conferir flexibilidad a la respuesta inmune en el paciente séptico.

Los reportes señalan que una alta producción de IL-10 podría estar asociada con la susceptibilidad y el resultado de la sepsis (1, 2, 4, 11). Mostrando el alelo -1082A una alta asociación con la susceptibilidad a sepsis. Sin embargo en este estudio, a pesar que el alelo A fue el más frecuente (80,6%) entre los pacientes que desarrollaron sepsis no se encontró asociación con el desarrollo de la enfermedad. Por otra parte se ha establecido que el alelo G se relaciona con el incremento en la producción

de la IL-10 y de la mortalidad, el resultado de este estudio no encontró esta asociación.

La discrepancia en los resultados se debe quizás a las características genéticas entre poblaciones. Un metaanálisis que incluyó 11 estudios realizados con poblaciones asiáticas y caucásicas mostró que había una asociación entre el polimorfismo IL-10 1082A/G y la susceptibilidad a la sepsis según el modelo de comparación de genotipos, en el caso de la poblaciones asiáticas (GG vs AA: OR = 0,39; IC 95% 0,21-0,73; P = 0,003; para GG vs AA / AG: OR = 0,36; IC 95% 0,14-0,92, P = 0,032), pero no hubo asociación similar en las poblaciones caucásicas (6). La discrepancia en estos resultados puede explicar los hallazgos de este estudio (AA vs GG/AG: 1,625. IC 95% 0,452-5,848; P=0,455), en el que no encontramos asociación entre los genotipos del gen *il-10-1038*.

Cuando se estableció la asociación de los genotipos con los niveles plasmáticos de la IL-10 se encontró que el genotipo AA se relacionó en forma significativa con altos niveles de IL-10 durante las primeras 48 horas del ingreso de los pacientes a la UCI en concordancia con previos resultados (7, 10, 1).

CONCLUSIÓN

En este estudio se evidencia la asociación entre los altos niveles de le IL-10 en pacientes con el genotipo AA: sin embargo, es necesario incluir un mayor número de pacientes con la enfermedad con el fin de establecer si existe el SNP *il10-1038* y se puede relacionar con la susceptibilidad al desarrollo de la sepsis en nuestra población.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Wiersinga WJ, Leopold SJ, Cranendonk DR, van der Poll T. Host innate immune responses to sepsis. *Virulence*. 2014; 5(1):36-44
2. Bozza F, Salluh J, Japiassu A, Soares M, Assis E, Gomes R, Bozza M, Castro-Faria-Neto H, Bozza P: Cytokine profiles as markers of disease severity in sepsis: a multiplex analysis. *Crit Care* 2007, 11:R49.
3. Stanilova SA, Lyuba D. Miteva, Zhivko T. Karakolev, Chavdar S. Stefanov. Interleukin-10 -1082 promoter polymorphism in association with cytokine production and sepsis susceptibility. *Intensive Care Med* 2006; 25: 260-266
4. Zeng L, Gu W, Chen K, Jiang D, Zhang L, Du D, Hu P, Liu Q, Huang S, Jiang J: Clinical relevance of the interleukin 10 promoter polymorphisms in Chinese Han patients with major trauma: genetic association studies. *Crit Care* 2009, 13:R188.
5. Faix JD. Biomarkers of sepsis. *Crit Rev Clin Lab Sci* 2013; 50: 23-36
6. Pan W, Zhang AQ, Yue CL, Gao JW, Zeng L, Gu W, Jiang JX 2015. Association between interleukin-10 polymorphisms and sepsis: a meta-analysis. *Epidemiol Infect* 143: 366-375.
7. Stanilova SA, Functional relevance of IL-10 promoter polymorphisms for sepsis development. *Stanilova Critical Care* 2010; 14:119. <http://ccforum.com/content/14/1/119>.
8. Reinhart K, Bauer M, Riedemann NC, Hartog CS. New approaches to sepsis: molecular diagnostics and biomarkers. *Clin Microbiol Rev*. 2012; 25: 609-634.
9. Singer M, Deutschman CS, Seymour C, Shankar-Hari M, Annane D, Bauer Michael, et al. The Third International Con-

- sensus Definitions for Sepsis and Septic Choque (Sepsis-3). JAMA. 2016; 315(8):801-810. doi:10.1001/jama.2016.0287
10. Lowe PR, Galley HF, Abdel-Fattah A, Webster NR. Influence of interleukin-10 polymorphisms on interleukin-10 expression and survival in critically ill patients. Crit Care Med. 2003 Jan;31(1):34-8. doi: 10.1097/00003246-200301000-00005.
 11. Ouyang L, Lv YD, Hou C, Wu GB, He ZH. Quantitative analysis of the association between interleukin-10 1082A/G polymorphism and susceptibility to sepsis. Molecular Biology Reports 2013; 40: 4327–4332.