

ARTÍCULOS ORIGINALES

Asociación de polimorfismos de la región promotora del gen de la interleucina 10 con la urticaria papular por picadura de pulga

LILIAN ANDREA CASAS¹

ADRIANA CUÉLLAR²

ELIZABETH GARCÍA³

EVELYNE HALPERT⁴

ADRIANA RODRÍGUEZ⁵

CLAUDIA SATIZÁBAL³

ALBERTO GÓMEZ¹

Resumen

Objetivos. Establecer si los polimorfismos en la región promotora del gen de la IL-10 localizados en las posiciones -819 y -592 están asociados con la urticaria papular causada por la picadura de pulga, en pacientes pediátricos que asistieron a consulta de alergia o de dermatología a la Fundación Santa Fe de Bogotá, Colombia.

Métodos. La frecuencia de estos dos polimorfismos en el ADN fue analizada en 25 niños con urticaria papular y 22 controles por medio de PCR (*Polymerase Chain Reaction*) y RFLP (*Restriction Fragment Length Polymorphisms*).

Resultados. No hubo diferencias significativas entre las frecuencias alélicas y genotípicas de cada polimorfismo individual o SNP (-819 o -592) entre pacientes y controles ($p=0,21$, $OR=1,87$, $IC95\% 0,79-4,40$) cuando fueron calculados por la prueba exacta de Fisher.

Conclusiones. Aunque en este trabajo preliminar no se encontró asociación de los polimorfismos reportados en otras poblaciones con la enfermedad alérgica, hay una tendencia en nuestros experimentos a encontrar un mayor número de haplotipos AT en pacientes que en controles.

1 Instituto de Genética Humana, Facultad de Medicina, Pontificia Universidad Javeriana, Bogotá, D.C., Colombia.

2 Departamento de Microbiología, Facultad de Ciencias, Pontificia Universidad Javeriana, Bogotá, D.C., Colombia.

3 Servicio de Alergología Pediátrica, Fundación Santa Fe de Bogotá, Bogotá, D.C., Colombia.

4 Servicio de Dermatología Pediátrica, Fundación Santa Fe de Bogotá, Bogotá, D.C., Colombia.

5 Universidad Militar Nueva Granada, Bogotá, D.C., Colombia.

Los resultados publicados por nuestro grupo de investigación, en cuanto a que la secreción de IL-10 *in vitro* se encuentra disminuida en pacientes con urticaria papular y no en controles sanos, indicarían que la expresión genética de esta citocina estaría alterada en pacientes y, por consiguiente, esta condición estaría exacerbando la enfermedad. Los niveles disminuidos de esta citocina reguladora permitirían el desarrollo de condiciones hiperinmunes, como la alergia y la autoinmunidad.

Palabras clave: citocinas, SNP, alergia, urticaria papular.

Title

Association of Interleukin 10 (IL-10) gene promoter region polymorphisms with Flea Bite Papular Urticaria

Abstract

Objectives: In this study we aimed to establish whether IL-10 promoter region genetic polymorphisms in positions -819 and -592 were associated with papular urticaria caused by flea bite in pediatric patients from the Fundación Santa Fe de Bogotá, Colombia.

Methods: The frequency of these DNA polymorphisms was analyzed in 25 infants suffering papular urticaria and 22 healthy controls, after amplification of their corresponding DNA through polymerase chain reaction (PCR) and further analysis of resulting restriction fragment length polymorphisms (RFLP).

Results: We found no significant differences in allelic and genotypic frequencies of either -819 or -592 SNPs between patients and healthy controls ($p=0.21$, $OR=1.87$, $95\% IC=0.79-4.40$).

Conclusions: Although we did not find in this preliminary study a genetic association between papular urticaria and previously reported allergy-associated SNPs such as -819 and -592, we found higher numbers of allergy-associated AT haplotypes in patients than in controls. Previously published results from our group showed *in vitro* a diminished IL-10 secretion in patients and not in

healthy controls. This finding, together with our present results, would indicate that the genetic expression of this cytokine could be altered in patients and that this condition could determine the exacerbation of papular urticaria. Low levels of this cytokine would allow for the development of hyperimmune conditions such as allergy and autoimmunity.

Key words: cytokines, SNP, allergy, papular urticaria

Introducción

La urticaria papular ha sido definida tradicionalmente como una enfermedad alérgica crónica, causada por la exposición a ectoparásitos como la pulga. Se ha demostrado que las manifestaciones clínicas de urticaria papular por picadura de pulga son más frecuentes en niños de un año de edad, aproximadamente, y, en la mayoría de los casos, mejoran alrededor de los siete años de edad[1].

La presencia de eosinófilos en muestras de biopsias de esta condición, el predominio de células T CD4 positivas en las lesiones y la respuesta de IgE, sugieren una respuesta inmune tipo Th2 a las proteínas de la pulga en estos pacientes[2]. Aunque se ha definido como una reacción alérgica, los mecanismos inmunológicos de la urticaria papular por picadura de pulga no se han establecido. Se ha demostrado que, en cultivos de células dendríticas de pacientes con urticaria papular estimuladas con lipopolisacá-

ridos, éstas secretan niveles menores de IL-10 que las células dendríticas de controles sanos en las mismas condiciones[3]. Los factores genéticos podrían desempeñar un papel importante en la predisposición a esta condición.

La IL-10 es una citocina con propiedades antiinflamatorias que tiene la característica de inhibir la función de los macrófagos y de las células dendríticas, lo que afecta la producción de citocinas proinflamatorias, como IL-4, IL-5, INF-g y FNT-a[4]. La producción de IL-10 está asociada a los niveles de transcripción de esta proteína[5], los cuales, a su vez, se han relacionado con polimorfismos genéticos localizados en la región promotora del gen de esta citocina[6]. Se ha reportado, en particular, la asociación de tres polimorfismos en las posiciones -1082, -819 y -592 con los niveles de expresión de IL-10, y se ha encontrado que el haplotipo para los alelos -1082A/-819T/-592A (o ATA) está asociado con disminución de la producción de IL-10, al compararlo con el haplotipo -1082G/-819C/-592C (o GCC)[5, 7, 8].

Varios estudios han reportado asociación del haplotipo ATA con enfermedades alérgicas, como asma[9-11] y dermatitis atópica[12, 13]. También, fue asociado con niveles elevados de IgE en suero y con recuentos altos de eosinófilos[10, 13].

El objetivo de este estudio fue establecer si existe asociación entre los polimorfismos -592 C/A y -819 C/T en la región promotora del gen que codifica para la IL-10 y la presencia de urticaria papular por picadura de pulga.

Materiales y métodos

Población

La población de estudio incluyó 25 pacientes con edades de 0 a 16 años, con diagnóstico clínico de urticaria papular por picadura de pulga, atendidos por el Servicio de Dermatología y Alergia en la Fundación Santa Fe, Bogotá, Colombia. Se incluyeron 22 controles sanos de la misma institución con indicación quirúrgica ambulatoria, que pertenecían al mismo grupo de edad y presentaban las mismas características socioeconómicas de los pacientes del estudio.

Esta investigación fue aprobada por los comités de ética de la Fundación Santa Fe de Bogotá y de la Pontificia Universidad Javeriana.

El diagnóstico de urticaria papular por picadura de pulga fue hecho acorde a las siguientes características clínicas: lesiones que se presentaron usualmente como pápulas con prurito, que aparecían intermitentemente en un curso crónico y se convirtieron en má-

culas hipopigmentadas o hiperpigmentadas, localizadas en las áreas en las que las prendas presionan la piel, como los tobillos (calcetines) y la cintura (pretina). En algunos pacientes, se encontraron áreas expuestas afectadas, principalmente en las extremidades.

Genotipificación

El ADN se extrajo por el método de *salting out*, a partir de sangre total que contenía EDTA. Posteriormente, todas las muestras extraídas se separaron en alícuotas y se conservaron a -20°C .

Se realizó el análisis de los polimorfismos de IL-10 en las posiciones -819 y -592. El segmento de la región promotora del gen de la IL-10 entre las posiciones -1120 y -533, se amplificó por la reacción en cadena de la polimerasa (PCR), realizada en el termociclador (iCicler, Bio Rad), en un volumen de reacción de 50 μl , así: 250 ng de ADN, 20 mM Tri HCl, pH 8,0, 100 mM de KCl (Corpogen, Colombia), 2 mM MgCl_2 , 200 μM de cada dGTP, dATP, dTTP, dCTP (Promega, Madison, WI), 0,5 μM de cada iniciador (5'-ATCCAAGACAACACTA CTAA-3' y 5'- AAATATCCTCA AAGTTCC-3') y 2,5 unidades de Taq polimerasa (Corpogen, Colombia). El ADN se amplificó con las siguientes condiciones: 95°C por 3 minutos; 30 ciclos de 95°C por 3 segundos, 46°C por 30 segundos y 72°C por 1 minu-

to; y una extensión final a 72°C por 3 minutos. El producto obtenido fue de 587 pb.

Se tomó una alícuota de 10 μl del producto de PCR y se sometió a la digestión enzimática correspondiente, por 4 horas a 55°C con la enzima *Mae III* para el polimorfismo -819, y con la enzima *RsaI* por 4 horas a 37°C , para el polimorfismo -592. Los fragmentos se separaron en gel de poliacrilamida al 12% (30:1).

Cada gel se coloreó con bromuro de etidio y se visualizó con luz ultravioleta. Existían dos alelos en la posición -819 C y T. La enzima *MaeIII* causó una escisión en el sitio de restricción en la posición -819 cuando estaba presente el alelo C, dando los siguientes fragmentos: 79, 217 y 292 pares de bases, o 79 y 509 pb cuando el alelo T estaba presente. Similarmente, en la posición -592, existen 2 alelos C y A. La enzima *RsaI* causó una escisión en el sitio de restricción en la posición -592, cuando el alelo A estaba presente, llevando a fragmentos de 42, 66, 232 y 240 pb, ó 42, 232, y 306 pb, cuando el alelo C estaba presente. Los individuos heterocigotos se identificaron por la presencia de una banda adicional.

Análisis estadístico

Se calcularon las frecuencias genotípicas y alélicas por conteo di-

recto. Estas frecuencias se compararon entre pacientes y controles mediante la prueba de ji al cuadrado (?²). Se calculó el equilibrio de Hardy-Weinberg en pacientes y controles.

Resultados

Se examinaron los polimorfismos de la región promotora del gen de IL-10 en 25 pacientes con diagnóstico de urticaria papular, 16 niños (64%) y 9 niñas (36%). Los controles incluyeron 16 niños (73%) y 6 niñas (27%), con un promedio de edad de 5,03 años.

La historia personal fue negativa para enfermedades atópicas (asma, rinitis alérgica, dermatitis atópica) en 52% de los pacientes, y ocho (32%) tenían historia familiar de urticaria papular.

Los alelos -819 y -592 se analizaron, además, en conjunto porque presentan transmisión ligada, lo cual corresponde a los genotipos TA o CC previamente descritos[7].

No se encontró desviación del equilibrio de Hardy-Weinberg en los grupos examinados; valor de p de IL-10 -592C/A, -819C/T fue de 0,991.

Las frecuencias genotípicas y alélicas de los polimorfismos se presentan en la tabla 1. No se encontraron diferencias estadísticamente significativas de las frecuencias alélicas (OR=1,87; IC95% 0,79-4,40; p=0,21 de T/A vs C/C) y genotípicas de los polimorfismos -819/-592 entre pacientes y controles (OR=2,5; IC95% 0,43-14,43; p=0,52 de TT/AA vs CT/CA + CC/CC; OR=2,12; IC95% 0,65-6,95; p=0,33 de TT/AA + CT/CA vs CC/CC).

Tabla 1
Frecuencias genotípicas y alélicas de polimorfismos de la región promotora de IL-10

| | Pacientes (n=25) | Controles (n=22) | p |
|---------------------------|------------------|------------------|------|
| Genotipo -819/-592 | | | |
| CC/CC | 8 (32%) | 11 (50%) | 0,33 |
| CT/CA | 12 (48%) | 9 (43%) | |
| TT/AA | 5 (20%) | 2 (10%) | 0,52 |
| Alelos -819/-592 | | | |
| C/C | 56% | 70% | 0,21 |
| T/A | 44% | 30% | |

Discusión

Las citocinas son mediadores críticos de la inmunidad y la inflamación, incluida la inmunidad innata, la presentación de antígenos, la diferenciación celular y la expresión de moléculas de adhesión. La IL-10 desempeña un papel importante en la regulación inmunitaria, ya que inhibe la secreción de muchas citocinas proinflamatorias, como IL-1, IL-4, IL-5, IL-6 y FNT- α .

Por su parte, la IL-10 es la principal citocina producida por las células T_{Reg} en alergia[14, 15]. Se ha demostrado el efecto de la IL-10 en enfermedades alérgicas, que se basa en la inducción de la tolerancia a alérgenos por células T[16], inhibición de la supervivencia de eosinófilos y potencial supresión de la IgE total y específica para el alérgeno, incrementa simultáneamente la producción de IgG4 en cultivos celulares[15, 17]. También, se ha demostrado que juega un papel importante en la regulación de los mastocitos, ya que tiene un efecto *in vivo* en el Fc ϵ RI en modelos de ratón, en los cuales la IL-10 sirve como un mediador de la homeostasis de los mastocitos, previniendo la activación excesiva y el desarrollo de inflamación crónica[18].

En el modelo humano, Cuéllar *et al.* encontraron una disminución estadísticamente significativa de los ni-

veles de IL-10 *in vitro*, en células dendríticas de pacientes con urticaria papular por picadura de pulga estimuladas con lipopolisacáridos[3]. Esta condición hace que la IL-10 se pueda considerar un regulador clave en la patogénesis de la urticaria papular y se convierta en un gen candidato para ser estudiado para un mejor entendimiento de la enfermedad. Por esta razón, analizamos la asociación de los polimorfismos de la región promotora de la IL-10 en pacientes con urticaria papular y en controles sanos.

Se han reportado tres polimorfismos localizados en el sitio de inicio de la transcripción en la posición -1082 G/A, -819 C/T, -592 C/A. El polimorfismo -1082 se encuentra en el sitio del reconocimiento ligado al factor de transcripción *Ets* (19,20). Similarmente, el polimorfismo -592 está localizado en la secuencia consenso de los miembros de la familia de Sp1[21], que incluye factores de transcripción que participan en la regulación negativa de la expresión de la proteína, mientras que el polimorfismo -819 puede afectar un elemento del receptor de estrógeno[20].

En términos generales, estos polimorfismos pueden afectar la unión de diferentes factores de transcripción, alterando la activación genética correspondiente. Se ha encontrado asociación del genotipo GG de -1082 con

niveles altos de la proteína IL-10 y el genotipo AA con disminución de la expresión de la IL-10, tanto *in vivo* como *in vitro*[7]. Se ha demostrado que el genotipo -592 afecta los niveles de expresión de esta proteína en células T, B y monocitos, *in vitro*[22]. El desequilibrio de ligamiento entre las posiciones -819 y -592 se ha asociado, además, con otra sustitución de nucleótidos G/A vecina en la posición -1082; el haplotipo ATA resultante ha demostrado ser determinante en los niveles de expresión de la IL-10. Así, los haplotipos GCC y ATA se correlacionan, respectivamente, con alta y baja producción de IL-10.

El presente podría ser el primer reporte en una posible asociación de los polimorfismos de IL-10 en urticaria papular. En nuestro estudio, no observamos diferencias estadísticamente significativas en los portadores de los polimorfismos -819/-592, al compararlos entre casos y controles. Sin embargo, observamos una clara tendencia a la acumulación del haplotipo TA en los pacientes, al compararlos con los controles, tanto como un mayor número y proporción de individuos con el haplotipo CC en los controles.

Observamos que estos dos polimorfismos están fuertemente ligados en el gen de la IL-10, lo cual se refleja en las frecuencias idénticas entre estos dos polimorfismos en la población

estudiada. Esta transmisión ligada, que conforma un haplotipo, se ha observado en otros estudios[7, 23], pero no en el de Chatterjee *et al.*, en el cual se encontró un nuevo haplotipo T/C conformado por estos dos alelos[9].

Aunque en nuestro estudio no encontramos asociación significativa de los haplotipos reportados en otras poblaciones en enfermedad alérgica, es importante resaltar que es la primera vez que se estudian polimorfismos genéticos de la IL-10 en la urticaria papular. Los hallazgos de nuestro grupo de investigación en cuanto a que la secreción de IL-10 *in vitro* se encuentra disminuida en los pacientes, hace pensar que los niveles de esta citocina son determinantes en esta enfermedad.

Karjalainen *et al.* tampoco encontraron relación de estos polimorfismos de IL-10 con susceptibilidad al asma, aunque sí encontraron asociación con el conteo de eosinófilos y los niveles de IgE[10]. De esta manera, estos autores proponen que los polimorfismos contribuirían a la gravedad de la enfermedad, al incidir sobre estos factores inmunológicos celulares y humorales de la alergia. Estos resultados indican que los polimorfismos descritos podrían estar directamente asociados con la regulación de otros factores que intervienen en las reacciones alérgicas.

Bibliografía

1. Ruiz-Maldonado R, Tamayo L. Prurigo infantil por insectos. Estudio de 300 casos. *Revista Mexicana de Pediatría*. 1973;42:743-59.
2. García E, Halpert E, Rodríguez A, Andrade R, Fiorentino S, García C. Immune and histopathologic examination of flea bite-induced papular urticaria. *Ann Allergy Asthma Immunol*. 2004; 92:446-52.
3. Cuéllar A, García E, Rodríguez A, Halpert E, Gómez A. Functional dysregulation of dendritic cells in patients with papular urticaria caused by flea bite. *Arch Dermatol*. 2007; 143:1415-9.
4. O'Garra A, Vieira P. T(H)1 cells control themselves by producing interleukin-10. *Nat Rev Immunol*. 2007;7:425-8.
5. 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;24:1-8.
6. Westendorp R, Langermans J, Huizinga T, Elouali A, Verweij C, Boomsma D, et al. Genetic influence on cytokine production and fatal meningococcal disease. *The Lancet*. 1997;349:170-3.
7. Suárez A, Castro P, Alonso R, Gutiérrez C. Interindividual variations in constitutive interleukin-10 messenger RNA and protein levels and their association with genetics polymorphisms. *Transplantation*. 2003;75:711-7.
8. Crawley E, Kay R, Sillibourne J, Patel P, Hutchinson I, Woo P. Polymorphic haplotypes of the interleukin-10 5' flanking region determine variable interleukin-10 transcription and are associated with particular phenotypes of juvenile rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum*. 1999;42:1101-8.
9. Chatterjee R, Batra J, Kumar A, Mabalirajan U, Nahid S, Niphadkar P, et al. Interleukin-10 promoter polymorphisms and atopic asthma in North Indians. *Clin Exp Allergy*. 2005;35: 914-9.
10. Karjalainen J, Hulkkonen J, Neiminen M, Huhtala H, Aromaa A, Klaukka T, et al. Interleukin-10 promoter region polymorphisms is associated with eosinophil count and circulating Immunoglobulin E in adult asthma. *Clin Exp Allergy*. 2003;33:78-83.
11. Lyon H, Lange C, Lake S, Silverman E, Randolph A. IL10 gene polymorphisms are associated with asthma phenotypes in children. *Genet Epidemiol*. 2004;26:155-65.
12. Shin H, Park B, Kim L. Interleukin-10 haplotypes associated with total serum IgE in atopic dermatitis patients. *Allergy*. 2005;60:1146-51.
13. Sohn MH, Song JS, Kim KW, Kim ES, Kim KE, Lee JM. Association of interleukin-10 gene promoter polymorphism in children with atopic dermatitis. *J Pediatr*. 2007;150:106-8.
14. Holgate S, Polosa R. Treatment strategies for allergy and asthma. *Nat Rev Immunol*. 2008;8:218-30
15. Akdis M. Healthy immune response to allergens: T regulatory cells and more. *Curr Opin Immunol*. 2006;18:738-44.
16. Enk A, Angeloni V, Udey M, Katz S. Inhibition of Langerhans cell antigen-

- presenting function by IL-10. A role for IL-10 in induction of tolerance. *J Immunol*. 1993;151:2390-8.
17. Punnonen J, de Waal Malefyt R, van Vlasselaer P, Gauchat J, de Vries J. IL-10 and viral IL-10 prevent IL-4-induced IgE synthesis by inhibiting the accessory cell function of monocytes. *J Immunol*. 1993;151:1280-9.
 18. Kennedy S, Barnstein B, Brenzovich J, Bailey DP, Kashyap M. IL-10 suppresses mast cell IgE receptor expression and signaling *in vitro* and *in vivo*. *J Immunol*. 2008;180:2848-54.
 19. Lazarus M, Hajeer A, Turner D, Sinnott P, Worthington J, Ollier W, *et al*. Genetic variation in the interleukin 10 gene promoter and systemic lupus erythematosus. *J Rheumatol*. 1997;24:2314-7.
 20. Kube D, Platzer C, von Knethen A, Straub H, Bohlen H, Hafner M, *et al*. Isolation of the human interleukin 10 promoter. Characterization of the promoter activity in Burkitt's lymphoma cell lines. *Cytokine*. 1995;7:1-7.
 21. Steinke J, Barezzi E, Hagman J, Borish L. Functional analysis of -571 IL-10 promoter polymorphisms association reveals a repressor element controlled by Sp1. *J Immunol*. 2004;173:3215-22.
 22. Steinke J, Barezzi E, Huyett P, Borish L. Differential interleukin-10 production stratified by -571 promoter polymorphism in purified human immune cells. *Cell Immunol*. 2007;249:101-7.
 23. Meenagh A, Williams F, Ross O, Patterson C, Gorodezky C, Hammond M, *et al*. Frequency of cytokine polymorphisms in populations from western Europe, Africa, Asia, the Middle East and South America. *Hum Immunol*. 2002;63:1055-61.