Identificación de variantes genéticas en genes asociados a la respuesta inmune Th1 y th2 en un grupo de personas de la ciudad de Cali

Daniel Alejandro Velásquez Osorio y
Valeria Velasco Tovar

Trabajo de grado presentada(o) como requisito parcial para optar al título de:
Microbiólogo

Director (a):
Andrés Jenuer Matta
Diana Carolina Zambrano

Línea de Investigación:
Microbiología Clínica

Universidad Santiago de Cali
Facultad de Ciencias Básicas,
Programa de Microbiología
Cali, Valle del Cauca, Colombia
2024

IMPACTOS

Relacione el (los) impacto(s) que presentó el Trabajo de Grado

IMPACTO	PRODUCTO	BENEFICIARIO(S)
Económico		
Responsabilidad social		
Científico	**Recopilación de polimorfismos asociados al sistema inmune y sus efectos en las proteínas**	**Comunidad de investigación genética clínica**
Indicadores de Gestión		
Tecnológico		
Técnico		
Ambiental		
Social		
Cultural		

Identificación de variantes genéticas en genes asociados a la respuesta inmune Th1 y th2 en un grupo de personas de la ciudad de Cali

Información de los autores: Valeria Velasco Tovar, Estudiante de microbiología, valeriavelascot15@gmail.com. Daniel Alejandro Velasquez Osorio, Estudiante de microbiología, daniel.velasquez00@usc.edu.co. Facultad de Ciencias Básicas. Universidad Santiago de Cali. Campus Pampalinda Calle 5 # 62-00. Santiago de Cali. Colombia.

RESUMEN

Introducción:
El estudio de las enfermedades y su relación con la genética se centra en mayor medida en las patologías autoinmunes y el cáncer, este enfoque ha dejado de lado las investigaciones que tienen como fin e estudiar las posibles interacciones que existen entre las mutaciones genéticas y la susceptibilidad de los individuos a infecciones, la idea de estudiar estas interacciones deriva de la presencia de distintos polimorfismos capaces de afectar la producción de distintas proteínas, dentro de las cuales se pueden encontrar las citoquinas, se conoce que son las encargadas de mediar en las interacciones que regulan el sistema inmune.

Objetivo:
Identificar polimorfismos en los genes que se expresan en las citoquinas que conforman las respuestas inmunes Th1 y Th2 en los genomas de personas sanas de la ciudad de Cali.

Metodología:
Para cumplir con el objetivo planteado este estudio utilizó información derivada del proyecto "Microbiota intestinal asociada a *Helicobacter pylori* y su relación con variantes en genes asociados con el desarrollo de cáncer gástrico en personas saludables del Valle del Cauca" en este caso se usó una base de datos con el locus y el tipo de polimorfismos encontrados en 23 individuos sanos, usando esta información se creó una base de datos discriminando los polimorfismos por su ubicación en el genoma que codifica para las citoquinas pertenecientes a las respuesta inmune Th1 y Th2, adicionalmente se organizaron los polimorfismos teniendo como fin el conocer la frecuencia de aparición en la población, cuál es su presencia en alélica y que tipo de polimorfismo es a su vez se evaluó el efecto de la presencia de los polimorfismos sobre las citoquinas.

Resultados:
Se encontraron 1342 mutaciones asociados a citoquinas en 23 pacientes, determinando que hay un total de 264 polimorfismos presentes en los participantes, de estos se obtuvieron 17 polimorfismos y 4 de ellos con un cambio proteico y solo 1 un cambio tanto proteico como una frecuencia alta para ser representativa.

Conclusiones:
Se logro identificar un polimorfismo capaz de causar cambios proteicos de 264 polimorfismos estudiados, el polimorfismo distinguido con un rs20541 puede traducirse en un cambio en la citoquina lo cual hace referencia a la interlucina 13, generando una alteración en el nucleótido de referencia y un cambio estructural de energía potencial en la interlucina 13.

1.1. **Palabras clave**

(Th1, Th2, inmunología, polimorfismos)

Identification of genetic variants in genes associated with the Th1 and Th2 immune response in a group of people from the city of Cali.

Abstract

Introduction: The study of diseases and their relationship with genetics is mostly focused on autoimmune pathologies and cancer, leaving aside the possible interactions that exist between genetic mutations and susceptibility to infections, this idea derives from how the presence of polymorphisms can affect the production of different proteins, within which cytokines can be found, which are responsible for mediating interactions that regulate the immune system, if it is possible to find a relationship between polymorphisms and how they affect the

correct functioning of the immune response, an advance in epidemiological control will be achieved by making use of the genetic analysis of a population.

Objective: To identify polymorphisms in genes that are expressed in cytokines that make up the Th1 and Th2 immune responses in the genomes of healthy people from the city of Cali.

Methodology: In order to fulfill the stated objective this study will use information derived from the project "Intestinal microbiota associated with Helicobacter pylori and its relationship with variants in genes associated with the development of gastric cancer in healthy people from Valle del Cauca" in this case we have available the position and which are the polymorphisms found in the 23 pairs of chromosomes of 23 different healthy subjects, from these databases a selection will be made based on the location within the chromosomes of the most recurrent cytokines in the studies of the functioning of the Th1 and Th2 immune response; when selecting the proteins and their locus, the genes of the 23 individuals will be organized having as purpose to know the frequency of appearance, which is its presence in allelic and which polymorphism is in turn the effect of the presence of the polymorphisms on the cytokines will be evaluated.

Results: We found 1342 mutations associated with key cytokines in 23 patients, determining that there are a total of 264 polymorphisms present in the participants, of these we obtained 17 polymorphisms and 4 of them with a protein change and only 1 with both a protein change and a high frequency to be representative.

Conclusions: We were able to identify a polymorphism capable of causing protein changes of 264 polymorphisms studied, the polymorphism distinguished with a rs20541 can be translated into a change in the cytokine which refers to interlucin 13, generating an alteration in the reference nucleotide and a structural change of potential energy in interlucin 13.

2.1. **Keywords:**(Th1, Th2, immunology, polymorphisms)

INTRODUCCIÓN

El sistema inmune es un conjunto de células especializadas las cuales hacen uso de distintas reacciones bioquímicas para controlar la respuesta inflamatoria, las reacciones bioquímicas ocurren entre distintas proteínas como las citoquinas y otras células, razón por la que las citoquinas se encuentran en continua producción e interacción con el fin de identificar y eliminar las potenciales amenazas que atentan con la salud del individuo (Zipp et al., 2023) , el determinar si existe un mal funcionamiento de un proceso tan importante para el organismo permite salvar vidas con meses o años de antelación, para lograr esto se hace uso del estudio de las enfermedades y su relación con la genética, como norma se asocian genes como marcadores genéticos que permiten rastrear la susceptibilidad de un individuo a distintas enfermedades (Taqi et al., 2024) , en mayor medida estos estudios se centran en las patologías autoinmunes y el cáncer, debido a la gravedad y frecuencia con la que se presenta el cáncer producto de una mutación del genoma como los polimorfismos, la alteración del genoma puede derivar en la desregulación de procesos necesarios para el correcto funcionamiento de las células, como la apoptosis, inestabilidad de los genes que participan en las respuestas inmunes inflamatorias (Rebolledo-Cobos & Yáñez-

Torregroza, 2018) .Al analizar la relación que existen entre las mutaciones genéticas y sus efectos en las citoquinas, tales como cambios estructurales, las variaciones en la energía libre de Gibbs y la estabilidad de las mismas, sumado a una comparación entre los individuos con presencia de los polimorfismos y qué enfermedades presentan con frecuencia, se genera un patrón de susceptibilidad a patógenos infecciosos (Singh et al., 2021) con esto en mente se eligieron los genes asociados a las respuestas inmunes Th1 y Th2, la relevancia de estos para el correcto funcionamiento del sistema inmune las hizo ideales para la investigación, debido a que se encargan de eliminar patógenos como virus y bacterias intracelulares en el caso de la Th1 y helmintos por parte de la Th2 (Butcher & Zhu, 2021; Hirahara & Nakayama, 2016), para esto se clasificaron los polimorfismos por tipo de variación y frecuencia, a su vez se buscó la bibliografía asociada a estos, finalmente los polimorfismos capaces de alterar las frecuencias genéticas se analizaron los cambios químicos, físicos y de energía de Gibbs, por lo cual al analizar personas sanas se desea encontrar cambios genéticos que tengan una presencia mayor en esta población, formándose una base de datos con genes que afecten de manera positiva a la resistencia a infecciones.

MATERIALES Y MÉTODOS

Para cumplir con el objetivo planteado este estudio utilizó información derivada del proyecto "Microbiota intestinal asociada a *Helicobacter pylori* y su relación con variantes en genes asociados con el desarrollo de cáncer gástrico en personas saludables del Valle del Cauca" radicado en la Dirección General de Investigaciones de la Universidad Santiago de Cali con el número 934-621123-221. Se realizo un estudio de tipo observacional descriptivo de corte transversal en el que se incluirán 23 personas mayores de 18 años, toma de muestra de sangre periférica para extracción del ADN que se usó para secuenciación exómica por NGS (Secuenciación de próxima generación) posterior análisis bioinformático de polimorfismos en los genes candidatos anteriormente mencionados asociados al desarrollo de cáncer gástrico. Para la toma de muestras de sangre periférica se contó con aval del comité de ética de la institución. Este estudio se realizó de acuerdo a la legislación de la República de Colombia, en particular a la Resolución No. 008430 de 1993 (4 de octubre de 1993) del Ministerio de Protección Social de Colombia, la normatividad del INVIMA, así como las Guías para Buenas Prácticas Clínicas de la Conferencia Internacional de Armonización, la Declaración de Helsinki y con sus modificaciones y las recomendaciones de la Oficina para la Protección de Sujetos Humanos de los Estados Unidos de América. El proyecto en consideración a sus acápites éticos se clasifica como de **riesgo mínimo** según el literal B del artículo 11 de la resolución mencionada. En cuanto a los riesgos potenciales derivados del manejo de material biológico, fueron minimizados cumpliendo con los procedimientos operacionales estándares (POES) de nuestro laboratorio.
En todos los casos, se garantizó la confidencialidad de los resultados.

Toma de sangre periférica.
La toma de las muestras de sangre periférica fue realizada por un profesional en bacteriología y laboratorio clínico capacitado para este procedimiento. Después de leer y firmar el consentimiento informado, cada participante se acomodó en posición sentado frente al profesional que toma la muestra, y extendió su brazo hacia él, acto seguido, el profesional con sus manos previamente lavadas y con guantes estériles de nitrilo nuevos, colocó el torniquete con el fin de visibilizar la vena a puncionar pidiendo al participante que abra y cierre el puño, luego, se procedió a realizar la desinfección del área a puncionar mediante una torunda de algodón impregnada con alcohol, limpiando el área con movimientos circulares de dentro hacia fuera del área sin repasar, posteriormente se procedió a puncionar el área con una aguja No. 21 unida a una camisa, la cual permitió la toma de muestra en un tubo vacutainer tapa lila con anticoagulante EDTA, para realizar la
extracción de la sangre, y un tubo vacutainer tapa roja sin anticoagulante, para la obtención de suero a ser utilizado en las pruebas bioquímicas.
Una vez recolectada la muestra de sangre en el tubo vacutainer, se procedió a retirar el torniquete, retirar el tubo recolector de muestra, y finalmente la aguja, descartándola inmediatamente en el guardián, garantizando con ello la bioseguridad del participante y del profesional de la salud; finalmente se coloca una cura en el sitio de la punción presionando para favorecer la coagulación.
Las muestras fueron transportadas a 4ºC, hasta el laboratorio, lugar en el que se realizó la extracción y secuenciación del ADN.

Extracción del ADN de sangre periférica.
El ADN de las muestras de sangre periférica fueron extraídos con el DNA easy extraction de QIAGEN, siguiendo el protocolo del fabricante. Posteriormente, se calcularon las concentraciones y grado de pureza del ADN, absorción (260/280) entre 1.8 a 2.0, con el Nanodrop, así como su calidad por medio de la amplificación de un segmento del gen constitutivo GAPDH.

Verificación del ADN por el gen GAPDH.
Después de llevar a cabo la extracción del ADN, se realizó una PCR para el gen GAPDH, el cual es un gen constitutivo, que permitió verificar las cualidades del ADN. Se usaron los siguientes pares de cebadores: forward 5´-CCATGGAGAAG GCTGGGG-3´ y reverse 5´-CAAAGTTGTCATGGATGACC-3´ que generó una banda de 300pb. En el siguiente programa de termociclador: denaturación por 1 minuto a 95° C, 35 ciclos con 45 segundos de denaturación a 94° C, 45 segundos de anneling a 58° C y 60 segundos de extensión a 72° C, terminando el proceso a 4° C.

Evaluación de variantes por secuenciación masiva.
Se hizo una secuenciación exómica en las personas seleccionadas, usando el DNA genómico extraído previamente de la muestra. Se prepara una librería con fragmentos del genoma y se seleccionó las regiones objeto de estudio mediante hibridación con sondas en solución usando la tecnología Agilent, estas regiones incluyen los exones y regiones intrónicas adyacentes (+/-5pb). La amplificación clonal y secuenciación de las regiones seleccionadas se hizo en la plataforma HiSeq2500/4000 de Illumina siguiendo la estrategia de pair-ends. La cobertura media de la muestra fue de 100x (≈95% de los pb diana cubiertas >20X). Los datos de salida de Illumina HiSeq se convirtieron de archivo BCL (.bcl) a archivo FastQ por el software Illumina CASAVA 1.8, y el estudio bioinformático se hizo por comparación con la secuencia genómica de referencia (GRCh38). Este análisis considera variantes aquellas alteraciones con un número de lectura >20 y un cociente de variante/lecturas >0,2.

Análisis bioinformático de las variantes observadas.
Se realizó una búsqueda exhaustiva de todas las variantes encontradas, para lo cual se utilizarán las siguientes bases de datos:

- Human Gene Mutation Database (HGMD) (http://www.hgmd.cf.ac.uk/ac/index.php).
- Ensembl Genome Browser (http://www.ensembl.org/index.html).
- Genome aggregation database (https://gnomad.broadinstitute.org)
- Varsome: the human genomic variant search engine (https://varsome.com/varsome-editions/varsome/)
- Leiden Open Variation Database (LOVD) (http://www.lovd.nl/3.0/home /).
- National Center for Biotechnology Information (NCBI) (http://www.ncbi.nlm.nih.gov/).
- Ensembl Genome Browser (http://www.ensembl.org/index.html).
- NHLBI Exome Sequencing Project (ESP) (http://evs.gs.washington.edu/EVS/).
- DECIPHER (https://www.deciphergenomics.org.).
- Genome aggregation database (https://gnomad.broadinstitute.org).

Análisis estadístico.
Los resultados se analizaron por medio del software SPSS para Windows. Mediante el software se realizó un análisis de las distribuciones de frecuencia y de las medidas de tendencia central de las variables estudiadas. Posteriormente se hizo un análisis bivariado para establecer asociación estadística ente las variantes genéticas, teniendo presente que una asociación estadísticamente significativa fue aquella que tenga (p <0,05) para esto se utilizó el software estadístico SPSS versión 21.

Una vez terminada la labor del equipo encargado del estudio “Microbiota intestinal asociada a *Helicobacter pylori* y su relación con variantes en genes asociados con el desarrollo de cáncer gástrico en personas saludables del Valle del Cauca”, se procedió a tratar las bases de datos en la que ese equipo recopiló los diferentes polimorfismos encontrados en los 23 participantes del estudio, el criterio de selección de los polimorfismos de interés fueron los polimorfismos relacionados a las respuestas inmunes Th1 y Th2, para mayor precisión se buscaron los genes de

las citoquinas INFA1, IL4, IL10, IL12A, IL12B, IL13, IL2 e IL5, para lograr esto se identificó el locus y se determinó el RS de los distintos polimorfismos asociados a estos genes.

Obtención del locus

Para conocer la posición de los genes se hizo uso del National Center for Biotechnology Information (NCBI) dentro de este se buscó el nombre de cada citoquina, seguido de esto se seleccionó la pestaña "Genomic context" se utilizó la anotación más actual disponible en el momento, dentro de esta se encontró en qué cromosoma se ubica el gen.

Recopilación de los RS

El RS (código de representación de mutaciones), es el código que se usa para identificar las distintas mutaciones para una mejor manipulación de los datos, al recopilar cada RS ligado a las mutaciones se utilizó el NCBI, al acceder a la página de un gen dentro de esta se encuentran distintas herramientas una de las pestañas disponibles es "Genomic regions, transcripts, and products" dentro de esta se introdujo la posición de cada polimorfismo de las distintas citoquinas seleccionadas para el estudio, seguido de esto el NCBI arroja distintos datos útiles, como el RS, tipo de variación, efecto de la variante y bibliografía asociada a este polimorfismo.

Para conocer más información acerca de los polimorfismos que se encuentren se utilizó The Genome Aggregation Database (gnomAD) esta brindó datos como como la frecuencia alélica y los cambios en las secuencias de proteínas, también llamados variantes (y a veces mutaciones o polimorfismos), se describen utilizando la nomenclatura HGVS

Identificación de los cambios proteicos

Para predecir los distintos cambios que otorgan los polimorfismos a las citoquinas se hará uso del software swiss-pdbviewer este nos permitió contrastar la proteína con y sin el polimorfismo, comparando los cambios en los puentes de hidrógeno, la estructura tridimensional y su energía de Gibbs.

Para conseguir el mapa tridimensional de cada una de las citoquinas evaluadas en este proyecto se utilizó el NCBI el cual posee una recopilación de estos mapas, cedidos por distintos estudios que han usado estas proteínas.

RESULTADOS

Se encontraron 1342 mutaciones asociados a citoquinas en las respuestas Th1 y Th2 en 23 pacientes, los genes a los que se le encontraron mutaciones fueron INFA1, IL4, IL10, IL12A, IL12B, IL13, IL2 e IL5. Una vez se encontraron las distintas mutaciones a estas se les determinó su RS, alelo, frecuencia, tipo de variación, seguido de esto se organizaron usando el locus de cada mutación, así definiendo que hay un total de 264 polimorfismos presentes en los participantes, los polimorfismos se dividieron por frecuencia y efecto de la variante, permitiendo encontrar los más relevantes

para la descripción de variantes de secuencias de proteínas HGVS, frecuencia de alelo y efecto de la variante se obtuvieron 17 polimorfismos de los 264 relevantes anteriores, de los cuales se representan en la tabla 1; De los 17 polimorfismos seleccionados 4 de ellos representan un cambio proteico y solo 1 un cambio tanto proteico como una frecuencia lo suficiente alta para ser representativa.

El polimorfismo que cumple con una frecuencia alta entre los genomas evaluados y su tipo de variación pueda traducirse en un cambio en su respectiva citoquina la cual es la interleucina 13, este fue el rs20541, este polimorfismo cambia el nucleótido de referencia, el cual es una adenina a una guanina, lo cual altera el codón correspondiente, alterando el aminoácido de referencia glutamina (GLN) por otro aminoácido la arginina (ARG), esto representa un cambio estructural (figuras 1,2,3,4 y 5) de energía potencial de la interleucina 13 (Tabla 2).

DISCUSIÓN (O ANÁLISIS DE RESULTADOS)

El determinar la naturaleza de los polimorfismos y su posible asociación con el funcionamiento de una proteína es esencial para rastrear la aparición de distintos tipos de enfermedades, en este estudio se encontraron 1342 SNP´s de estos}(exones), esto indica que la gran mayoría de las mutaciones se encuentran en zonas del genoma humano que no codifican para proteínas (intrones), esto refuerza la importancia de la segmentación del genoma en ADN codificante y no codificante, debido a que en la totalidad del ADN solo el 1% de este son exones (Valdespino-Gómez et al., 2013) la probabilidad de que aparezca una mutación en un exón se reduce considerablemente, por otro lado, la frecuencia alélica de los SNP´s encontrados en los exones fue baja a excepción del rs20541, mientras que las frecuencias alélicas encontradas en los intrones fueron en su mayoría altas, dejando en claro que las mutaciones encontradas en los intrones al no afectar la producción de proteínas, su impacto es menor lo cual facilita su heredabilidad puesto que al no alterar el funcionamiento del ser genoma, el portador de estas mutaciones no tendrá problemas para transmitir estos polimorfismos.

Al centrarse en el polimorfismo rs20541 este pertenece al gen que expresa la interleucina 13, este SNP´s se registró en un 73,9% de los participantes del estudio, a su vez se encuentra en el área codificante del gen y produce un cambio en el último codón de la secuencia, al tratarse de un cambio de una adenina a una guanina, el codón pasa de ser CAG a CGG lo cual altera el aminoácido que codifica, en su estado original este es glutamina (GLN) y con la mutación se produce arginina (ARG) estos dos aminoácidos son muy distintos en composición, este cambio altera el potencial de gibbs de la proteína, sumado al comparar la proteína antes dl cambio (figuras 2 y 3) con esta misma después del cambio (figura 4 y 5) se evidencia la perdida de 1 puentes de hidrógeno y la formación de uno nuevo, estos cambios no solo podrían generar un cambio en el funcionamiento y la estabilidad de la proteína, como indica el descenso en la energía de gibbs (Tabla 2); se asocia un potencial de gibbs bajo con una mayor dificultad de alterar las propiedades de una proteína, sumado a que la biosíntesis de compuestos celulares es competitiva, por lo que si un organismo infeccioso intracelular posee una energía de gibbs menor a las proteínas del huésped, tendrían una prioridad en el uso del metabolismo celular para la producción de las proteínas del organismo infeccioso (Popovic & Minceva, 2020) , por tanto si un agente infeccioso usa la interleucina 13 como medio para infectar el organismo, y esta última tiene su energía de gibbs menor a la del organismo infeccioso, actuaría como una protección extra frente a los posibles patógenos infecciosos como los virus, bacterias y parásitos que suelen alterar el funcionamiento del sistema inmune, para infectar al organismo blanco, sin embargo, al revisar la bibliografía asociada al rs20541 y se encontró una posible asociación de este polimorfismo con enfermedades respiratorias como el asma (Omraninava et al., 2022) sí bien se encontró un aumento de la estabilidad química de la interleucina 13, su papel el correcto funcionamiento respiratorio puede verse afectado por la presencia de este polimorfismo, por lo que se necesita mayor investigación.

CONCLUSIONES

Se identifico un polimorfismo, con una frecuencia alélica alta y capaz de genera un cambio proteico, es denominado con el rs2054, este generando una alteración del aminoácido de referencia (GLN) por (ARG), representando un cambio estructural y de energía potencial en la interlucina 13 aumentando la estabilidad química de la proteína.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Butcher, M. J., & Zhu, J. (2021). Recent advances in understanding the Th1/Th2 effector choice. *Faculty Reviews*, *10*. https://doi.org/10.12703/r/10-30 Hirahara, K., & Nakayama, T. (2016). CD4+ T-cell subsets in inflammatory diseases: Beyond the Th1/Th2 paradigm. In *International Immunology* (Vol. 28, Issue 4). https://doi.org/10.1093/intimm/dxw006 Omraninava, M., Eslami, M. M., Aslani, S., Razi, B., Imani, D., & Feyzinia, S. (2022). Interleukin 13 gene polymorphism and susceptibility to asthma: a meta-regression and meta-analysis. *European Annals of Allergy and Clinical Immunology*, *54*(4), 150–167. https://doi.org/10.23822/EURANNACI.1764-1489.180 Popovic, M., & Minceva, M. (2020). A thermodynamic insight into viral infections: do viruses in a lytic cycle hijack cell metabolism due to their low Gibbs energy? *Heliyon*, *6*(5). https://doi.org/10.1016/j.heliyon.2020.e03933 Rebolledo-Cobos, M., & Yáñez-Torregroza, Z. (2018). *Susceptibilidad genética frente al cáncer bucal por infección del virus del papiloma humano Gaceta Médica de México ARtíCulo de ReviSión*. https://doi.org/10.24875/GMM.18004408 Taqi, M., Ul Rasool, H., Haider, M. Z., & Al Muderis, M. (2024). *Significance of Biogenetic Markers in Giant Cell Tumor Differentiation and Prognosis: A Narrative Review*. https://doi.org/10.3390/diagnostics15010039 Zipp, F., Bittner, S., & Schafer, D. P. (2023). Cytokines as emerging regulators of central nervous system synapses. *Immunity*, *56*(5), 914–925. https://doi.org/10.1016/J.IMMUNI.2023.04.011/ASSET/F39AF726-1E49-4849-9905-BBF12BE08915/MAIN.ASSETS/GR2.JPG

Aljabali, A. A., Obeid, M. A., Bashatwah, R. M., Serrano-Aroca, Á., Mishra, V., Mishra, Y., El-Tanani, M., Hromić-Jahjefendić, A., Kapoor, D. N., Goyal, R., Naikoo, G. A., & Tambuwala, M. M. (2023). Nanomaterials and Their Impact on the Immune System. In *International Journal of Molecular Sciences* (Vol. 24, Issue 3). https://doi.org/10.3390/ijms24032008

Artini, K. S., & Veranita, W. (2021). Tanaman Herbal untuk Meningkatkan Sistem Imun Tubuh. *Jurnal Farmasetis*, *10*(1).

Butcher, M. J., & Zhu, J. (2021). Recent advances in understanding the Th1/Th2 effector choice. *Faculty Reviews*, *10*. https://doi.org/10.12703/r/10-30

Carrozzo⋆, M., Dametto, E., Fasano, M. E., Arduino, P., Bertolusso, G., Rendine, S., & Amoroso, A. (2006). Cytokine gene polimorphisms in mucous membrane pemphigoid predominantly affecting the oral cavity. *Oral Surgery, Oral Medicine, Oral Pathology, Oral Radiology, and Endodontology*, *102*(3), 329–330. https://doi.org/10.1016/J.TRIPLEO.2006.06.022

Citocinas y sus efectos secundarios. (n.d.). Retrieved June 12, 2024, from https://www.cancer.org/es/cancer/como-sobrellevar-el-cancer/tipos-de-tratamiento/inmunoterapia/citocinas.html

Delves, P. J., & Roitt, I. M. (2000). The Immune System. *New England Journal of Medicine*, *343*(1), 37–49. https://doi.org/10.1056/NEJM200007063430107

Elia, A. R., Inghirami, G., Circosta, P., Cristofani, F., Santoro, N., Sangiolo, D., Tarella, C., & Cignetti, A. (2011). Retargeting of Citokine-Induced Killer (CIK) Cells with Molecularly

Engrafted T-Cell Receptors (TCR): A Preclinical in Vitro and In Vivo Study. *Blood*, *118*(21), 1917. https://doi.org/10.1182/BLOOD.V118.21.1917.1917

Fernández Montoya, A. (n.d.). © *ANTONIO FERNÁNDEZ MONTOYA MEMORIA INMUNOLÓGICA, STRESS Y EMOCIONES*.

Frigolet, M. E., & Gutiérrez Aguilar, R. (2017). Ciencias "ómicas", ¿cómo ayudan a las ciencias de la salud? The "omics" sciences, how does this help health science? *Revista Digital Universitaria*, *18*, 4–9. http://dx.doi.org/10.22201/codeic.16076079e.2017.v18n7.a3.

Garcia, S. L. (2016). Mixed cultures as model communities: hunting for ubiquitous microorganisms, their partners, and interactions. *Aquatic Microbial Ecology*, *77*(2), 79–85. https://doi.org/10.3354/AME01789

García-Vicente, E. J., Rey-Casero, I., Martín, M., Pérez, A., Benito-Murcia, M., & Risco, D. (2024). Oral supplementation with postbiotics modulates the immune response produced by myxomatosis vaccination in wild rabbits. *Vaccine*. https://doi.org/10.1016/J.VACCINE.2024.05.026

Goodin, D. A., & Frieboes, H. B. (2023). Evaluation of innate and adaptive immune system interactions in the tumor microenvironment via a 3D continuum model. *Journal of Theoretical Biology*, *559*, 111383. https://doi.org/10.1016/J.JTBI.2022.111383

Hernández, A. S. (2009). Células colaboradoras (TH1, TH2, TH17) y reguladoras (Treg, TH3, NKT) en la artritis reumatoide. *Reumatología Clínica*, *5*(SUPPL. 1), 1–5. https://doi.org/10.1016/J.REUMA.2008.11.012

Hirahara, K., & Nakayama, T. (2016). CD4+ T-cell subsets in inflammatory diseases: Beyond the Th1/Th2 paradigm. In *International Immunology* (Vol. 28, Issue 4). https://doi.org/10.1093/intimm/dxw006

Li, H., Zang, Y., Wang, C., Li, H., Fan, A., Han, C., & Xue, F. (2020). The Interaction Between Microorganisms, Metabolites, and Immune System in the Female Genital Tract Microenvironment. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*, *10*, 609488. https://doi.org/10.3389/FCIMB.2020.609488/BIBTEX

Liu, C., Chu, D., Kalantar-Zadeh, K., George, J., Young, H. A., & Liu, G. (2021). Cytokines: From Clinical Significance to Quantification. *Advanced Science*, *8*(15). https://doi.org/10.1002/ADVS.202004433

Mehmood, M. A. (2014). Volume 5 • Issue 2 • 1000158. *Article in Journal of Data Mining in Genomics & Proteomics*, *5*(2). https://doi.org/10.4172/2153-0602.1000158

MSD Salud. (2016). *¿Qué es una infección?* | *MSD Salud*. Madridmasd.Org.

Olalla Herbosa, R., & Tercero Gutiérrez, M. J. (2011). Parasitosis comunes internas y externas. Consejos desde la oficina de farmacia. *Offarm*, *30*(4), 33–39. https://www.elsevier.es/es-revista-offarm-4-articulo-parasitosis-comunes-internas-externas-consejos-X0212047X11247484

Pruitt, K. D., Katz, K. S., Sicotte, H., & Maglott, D. R. (2000). Introducing RefSeq and LocusLink: Curated human genome resources at the NCBI. *Trends in Genetics*, *16*(1), 44–47. https://doi.org/10.1016/S0168-9525(99)01882-X

Ruiz, D. H., Martínez, M. H., Caraballo, D. F., & Ocampo, L. G. L. (2017). Asociación entre polimorfismos de Glutation s-transferasa y cáncer cérvico uterino. *Revista Cubana de Obstetricia y Ginecología*, *43*(3), 163–172. http://scielo.sld.cuhttp://scielo.sld.cu

Sompayrac, L. (2022). *How the immune system works* (2022 John Wiley & Sons, Ed.; 7th, ilustrada ed.). Wiley. https://books.google.com/books/about/How_the_Immune_System_Works.html?hl=es&id=lVKMEAAAQBAJ

Varela, Z. S., Lavalle, L. P., & Alvarado, D. E. (2016). Bacterias causantes de enfermedades transmitidas por alimentos: una mirada en Colombia. *Revista Salud Uninorte*, *32*(1), 105–122. https://doi.org/10.14482/SUN.32.1.8598

Zipp, F., Bittner, S., & Schafer, D. P. (2023). Cytokines as emerging regulators of central nervous system synapses. *Immunity*, *56*(5), 914–925. https://doi.org/10.1016/J.IMMUNI.2023.04.011/ASSET/F39AF726-1E49-4849-9905-BBF12BE08915/MAIN.ASSETS/GR2.JPG

Poggiale, J. C., Bravo de la Parra, R., & Venturino, E. (2024). The role of manipulative trophically transmitted parasites in the stability of a predator–prey community. Nonlinear Analysis: Real World Applications, 79, 104123. https://doi.org/10.1016/J.NONRWA.2024.104123

Valdespino-Gómez, V. M., Valdespino-Castillo, P. M., & Valdespino-Castillo, V. E. (2013). Organización estructural y funcional del genoma humano: variación en el número de copias predisponentes de enfermedades degenerativas. *Gaceta Mexicana de Oncología*, *12*(6), 426–432. https://www.elsevier.es/es-revista-gaceta-mexicana-oncologia-305-articulo-organizacion-estructural-funcional-del-genoma-X1665920113687258

ANEXO 1: INFORMACION ADICIONAL

Tabla 1. genes asociados a la respuesta inmune Th1

Citoquinas	Gen	Cromosoma	Ubicación	Funcionamiento	Link
IFNA 1	https://www.ncbi.nlm.nih.gov/nuccore/NC_000009.12?report=fasta&from=21440439&to=21441316	9	21,440,439..21,441,316	son glicoproteínas monocatenarias que al entrar en contacto con receptores de la membrana célular, activan la transcripcción de génes que protegen a la célula de una infección viral	https://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/3439
IL-2	https://www.ncbi.nlm.nih.gov/nuccore/NC_000004.12?report=fasta&from=122451470&to=122456725&strand=true	4	122,451,470..122,456,725	Esta estimula la producción de linfocitos T y B su alteración en ratones causa una enfermedad similar a la colítis ulcerosa	https://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/3558
TNF-ß	https://www.ncbi.nlm.nih.gov/nuccore/NC_000006.12?report=fasta&from=31575565&to=31578336	6	31,575,565..31,578,336	Funciona como un supresor la creación de vasos sanguineos, la hemostasia, es pro inflamatoria, esto le permite causar la muerte hemorrágica del tumor	https://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/7124

IL12 A	https://www.ncbi.nlm.nih.gov/nuccore/NC_000003.12?report=fasta&from=159988835&to=159996019	3	159,988,835..159,996,019	Inhibe la producción de las citoquinas asociadas a las células Th2, sumado a que incita la producción de IFN y IL-2, si las dos subunidades no se encuentran no son orgánicamente activas	https://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/3592
IL 12 B	https://www.ncbi.nlm.nih.gov/nuccore/NC_000005.10?report=fasta&from=159314780&to=159330487&strand=true	5	159,314,780..159,330,487		https://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/3593

Tabla 2. polimorfismos asociados a la respuesta inmune Th1

GEN	UBICACIÓN	Polimorfismo		hgvs	Frecuencia	rs	Tipo de variación	Efecto de la variante	splice al
IL2	122453390	G	AT	-	21	N/I			-
	122454455	A	G	-	22	rs1479920	SNV	IL2 : Intron Variant	-
IL12A	159989732	A	G	-	14	rs647801	SNV	IL12A : Intron Variant/IL12A-AS1 : Intron Variant	-
	159992214	A	T	-	15	rs582054	SNV	IL12A : Intron Variant/IL12A-AS1 : Intron Variant	-
	159992311	A	C	-	13	rs582537	SNV	IL12A : Intron Variant/IL12A-AS1 : Intron Variant	-
	159992603	G	A	-	13	rs583911	SNV	IL12A : Intron Variant/IL12A-AS1 : Intron Variant	-
	159994267	G	T	-	12	rs2227314	SNV	IL12A-AS1 : Non Coding Transcript Variant/IL12A : Intron Variant	-
	159995206	G	C	-	13	rs2243135	SNV	IL12A : Intron Variant/IL12A-AS1 : Intron Variant	-
IL12B	159315006	G	T	-	17	rs1368439	SNV	IL12B : 3 Prime UTR Variant/LOC105377683 : Intron Variant	-
	159317652	T	C	-	18	rs2853696	SNV	IL12B : Intron Variant	-
	159322080	G	T	-	15	rs2853694	SNV	IL12B : Intron Variant	-
	159328837	G	A	-	19	rs1433048	SNV	IL12B : Intron Variant	-

	159329219	**T**	**C**	**-**	**14**	**rs730691**	**SNV**	**IL12B : Intron Variant**	**-**

Tabla 3. genes asociados a la respuesta inmune Th2

Citoquinas	Gen	Cromosoma	Ubicación	Funcionamiento	link
IL-4	https://www.ncbi.nlm.nih.gov/nuccore/NC_000005.10?report=fasta&from=132673989&to=132682678	5	132,673,989..132,682,678	Toma el papel de estimulante para la diferenciación de Th0 a Th2	https://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/3565
IL-5	https://www.ncbi.nlm.nih.gov/nuccore/NC_000005.10?report=fasta&from=132541445&to=132556815&strand=true	5	132,541,445..132,556,815	Influye en la producción de las celulas B y los eosinófilos, formando un papel en la infección por parásitos	https://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/3567
IL-10	https://www.ncbi.nlm.nih.gov/nuccore/NC_000001.11?report=fasta&from=206767602&to=206772494&strand=true	1	206,767,602..206,772,494	Actua como inhibidor en la producción de citoquinas asociadas con Th1, lo que favorece el correcto funcionamiento de la Th2	https://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/3586
IL-13	https://www.ncbi.nlm.nih.gov/nuccore/NC_000005.10?report=fasta&from=132656522&to=132661110	5	132,656,522..132,661,110	Funciona como un inhibidor de la actividad de los macrófagos, evitando la producción de compuestos proinflamatorios, a su vez ayuda a la diferenciación de las células B	https://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/3596

Tabla 4. polimorfismos asociados a la respuesta inmune Th2

GEN	Ubicación	Polimorfismo	Frecuencia	HGSV	rs	Tipo de variación	Efecto de la variante	Alelo	alelo freuencia	SpliceAI

IL4	132677033	T	G	11	-	rs2227284	SNV	IL4 : Intron Variant	HE/HoA	-	-
	132677487	C	G	10	-	rs2227282	SNV	IL4 : Intron Variant	HE/HoA	-	-
	132677607	C	G	17	-	rs2243263	SNV	IL4 : Intron Variant	HoA/HE	-	-
	132678097	G	A	10	-	rs2243266	SNV	IL4 : Intron Variant	HE	-	-
	132678417	A	G	10	-	rs2243270	SNV	IL4 : Intron Variant	HE/HoA	-	-
	132681301	T	G	11	-	rs2243285	SNV	IL4 : Intron Variant/LOC105379176 : Intron Variant	HoA	-	-
IL5	132551850	G	C	22	-	rs2522408	SNV	IL5 : Intron Variant	HE/HA	-	-
	132552162	A	G	17	-	rs2522407	SNV	IL5 : Intron Variant	HA	-	-
	132553417	A	G	17	-	rs2522406	SNV	IL5 : Intron Variant	HE/HA	-	-
	132554297	G	A	18	-	rs2548988	SNV	IL5 : Intron Variant	HE/HA	-	-
	132554779	C	T	11	-	rs2706334	SNV	IL5 : Intron Variant	HE/HA	-	-
	132555737	C	G	20	-	rs2522404	SNV	IL5 : Intron Variant/RAD50 : 2KB Upstream Variant	HE	-	-
	132555984	GT	G	19	-	N/I			HE/HA	-	-
	132556665	C	T	16	c.42+9G>A †	rs2706335	SNV	IL5 : Intron Variant/RAD50 : 2KB Upstream Variant	HE	0.9919	-
IL10	206768519	A	G	10	-	rs3024496	SNV	IL10 : Non Coding Transcript Variant	HE/HoA	-	-
	206770006	T	C	18	-	rs3024494	SNV	IL10 : Intron Variant IL19 : 2KB Upstream Variant	HoA	-	-

	206770888	A	G	13	c.378+19T>C	rs1554286	SNV	IL19 : Intron Variant IL10 : Intron Variant	HoA/HE	0.6568	-
	206771300	T	C	14	c.225+56A>G	rs1518111	SNV	IL10 : Intron Variant IL19 : Intron Variant	HoA/HE	0,6351	-
	206771516	A	C	15		rs1518110	SNV	IL10 : Intron Variant IL19 : Intron Variant	HoA/HE	-	-
	206771966	A	C	13		rs3024490	SNV	IL10 : Intron Variant IL19 : Intron Variant	HoA	-	-
IL13	132657117	C	T	10		rs1800925	SNV	IL13 : Intron Variant/TH2LCRR : 2KB Upstream Variant	HoA/HE		-
	132658770	C	G	21		rs1295687	SNV	IL13 : Intron Variant	HoA/HE		-
	132660272	A	G	17	p.Gln144Arg	rs20541	SNV	IL13 : Missense Variant	HoA	0.5408	-
	132660272	A	G	17		rs1295685	SNV	IL13 : 3 Prime UTR Variant	HoA/HE		-
	132660808	A	C	13		rs848	SNV	IL13 : 3 Prime UTR Variant	HE/HoA		-
	132660977	T	C	21		rs847	SNV	IL13 : 3 Prime UTR Variant	HoA		-

Tabla 4. Representa los 17 polimorfismo, que presentan un cambio en el efecto de la variante, la frecuencia de alelo y el HGVS.

LOCUS	Citoquina	Referencia	Alternativo	HGSV	FRECUENCIA	RS	EFECTO DE LA VARIANTE	ALELO	FRECUENCIA DE ALELO
159995680	**12B**	**G**	**A**	**n.1570G>A**	**2**	**rs568408**	**IL12A-AS1 : Intron Variant/IL12A : 3 Prime UTR Variant**	**HE**	**0.07355**
132674018	**IL4**	**C**	**T**	**c.-33C>T**	**9**	**rs2070874**	**IL4 : 5 Prime UTR Variant**	**HE/HoA**	**0.3963**

1325 4183 2	IL5	G	T	p.Thr128Thr	3	rs2069818	IL5 : Synonymous Variant	HE	0.008347
1326 6027 2	IL13	A	G	p.Gln144Arg	17	rs20541	IL13 : Missense Variant	HoA	0.5408
2144 0995	IFNA1	C	G	p.Ala163Gly	1	rs28383794	IFNA1 : Missense Variant	HE/HoA	0.06591
2144 0536	IFNA1	T	C	p.Val10Ala	2	rs1758567	IFNA1 : Missense Variant	HE	0.04125
1325 5573 7	IL5	C	G	c.-168-3547C>G	20	rs2522404	IL5 : Intron Variant/RAD50 : 2KB Upstream Variant	HE	0.9720
1325 5666 5	IL5	C	T	c.-168-2619C>T	16	rs2706335	IL5 : Intron Variant/RAD50 : 2KB Upstream Variant	HE	0.9919
2067 6884 2	IL10	C	T	-	1	rs45587633	IL10 : Intron Variant IL19 : 2KB Upstream Variant	HE	0.003804
2067 6891 0	IL10	A	G	-	2	rs79782619	IL10 : Intron Variant IL19 : 2KB Upstream Variant	HE/HoA	0.003334
2067 6906 8	IL10	C	T	-	3	rs3024495	IL10 : Intron Variant IL19 : 2KB Upstream Variant	HE	0.07874
2067 6977 1	IL10	T C	C	-	1	rs5743627	IL10 : Intron Variant IL19 : 2KB Upstream Variant	HE	0.03493
2067 7036 8	IL10	G	C	-	7	rs1878672	IL10 : Intron Variant IL19 : 2KB Upstream Variant	HE	0.2920
2067 7062 3	IL10	C	A	-	3	rs3024493	IL10 : Intron Variant IL19 : 2KB Upstream Variant	HE	0.07288
2067 7000 6	IL10	T	C	-	18	rs3024494	IL10 : Intron Variant IL19 : 2KB Upstream Variant	HoA	0.9929

Tabla 5. Comparación de energía de Gibbs antes y después de la presencia del polimorfismo en la interleucina 13

aminoácido	Enlazados	Ángulo	Torsión	Improper	No enlazados	Restricción electrostática	Total
ARG A111	1,780	1,489	13,800	0,627	1,40	-243,11	-224
suma	210,665	319,728	1.044,639	60,993	-372,190	-2340	-1.076.165
GLN A111	0,984	1,364	5,819	0,507	212,810	-174,6	46,892
suma	209,87	319,603	1036,658	60,673	25,39	-2280,67	-628,274

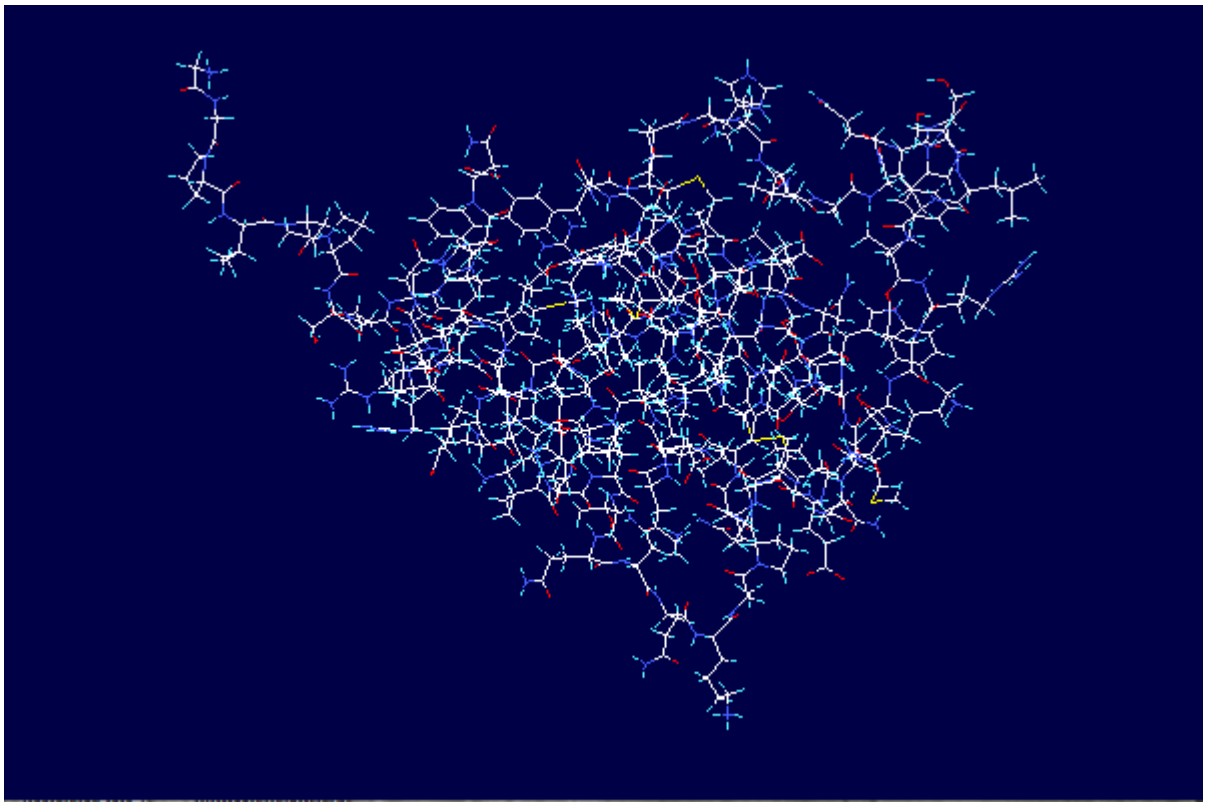

Figura 1 imagen tomada usando Swiss-Pdb viewer de la estructura tridimensional de la interleucina 13

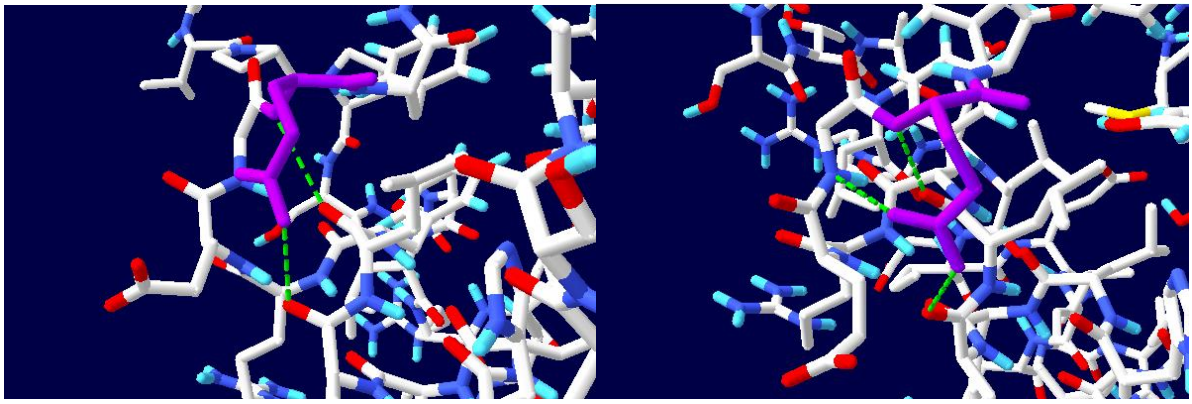

Figura 2 y 3 imagen tomada usando Swiss-Pdb viewer de la interleucina 13 resaltando el aminoácido de referencia glutamina en color purpura.

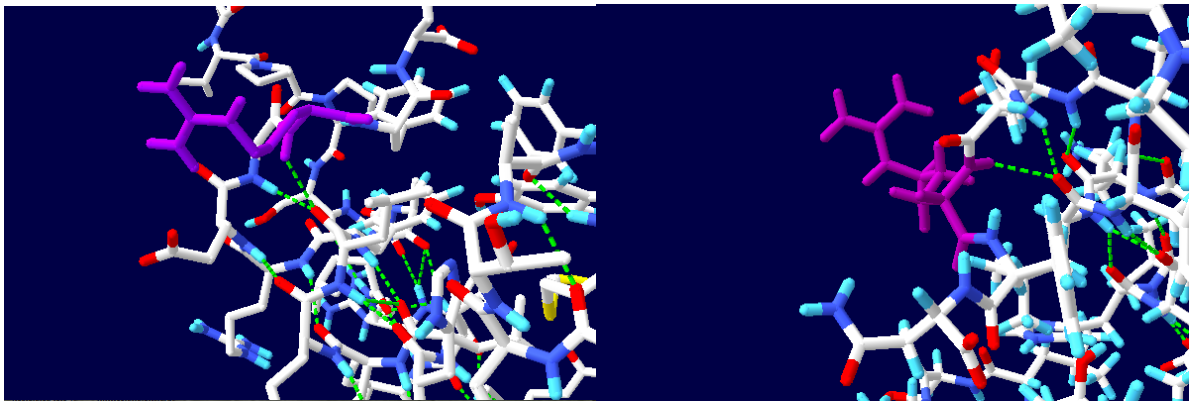

Figura 4 y 5 imagen tomada usando Swiss-Pdb viewer de la interleucina 13 resaltando el aminoácido de referencia arginina en color purpura.