

**UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN**

**FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS**



**ASOCIACION DE LA SUSCEPTIBILIDAD POR LA INFECCION DEL VIRUS  
CHIKUNGUNYA CON POLIMORFISMOS DE LOS GENES OAS**

Por

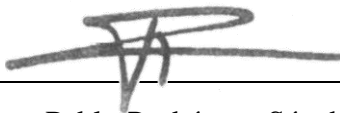
**M.C. MARTHA PATRICIA LÓPEZ RODRÍGUEZ**

Como requisito para obtener el grado de  
**DOCTOR EN CIENCIAS CON ACENTUACIÓN EN ENTOMOLOGÍA MÉDICA.**

2023

**ASOCIACION DE LA SUSCEPTIBILIDAD POR LA INFECCION DEL VIRUS  
CHIKUNGUNYA CON POLIMORFISMOS DE LOS GENES OAS**


**Comité de Tesis**



---

Dr. Iram Pablo Rodríguez Sánchez

Presidente



---

Dra. Adriana E. Flores Suárez

Secretaria



---

Dra. Beatriz López Monroy

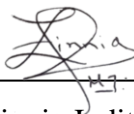
Vocal



---

Dra. Susana Favela Lara

Vocal



---

Dra. Zinnia Judith Molina

Vocal



---

Dra. Katiushka Arévalo



SUBDIRECCIÓN  
DE POSGRADO

Subdirector de Posgrado

**ASOCIACION DE LA SUSCEPTIBILIDAD POR LA INFECCION DEL VIRUS  
CHIKUNGUNYA CON POLIMORFISMOS DE LOS GENES OAS**

**Dirección de Tesis**



---

**Dr. Iram Pablo Rodríguez Sánchez**


Director



---

**Dr. Gerardo de Jesús Trujillo-Rodríguez**

Asesor Externo



---

**Dra. María de Lourdes Ramírez Ahuja**

Asesor Externo

## **AVISO DE DERECHOS DE AUTOR**

DERECHOS RESERVADOS©

PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta Tesis está protegido, el uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material contenido que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde se obtuvo mencionando al autor o autores.

## **AGRADECIMIENTOS**

Primeramente, quiero agradecer al Laboratorio de Fisiología Molecular y Estructural en la Facultad de Ciencias Biológicas de la Universidad Autónoma de Nuevo León. Al CONACYT por otorgarme el apoyo de la beca durante 3 años. A la Universidad Autónoma de Chiapas (UNACH).

En general agradezco por todo el apoyo brindado durante el tiempo correspondiente.

## **RETRIBUCIONES**

Quiero agradecer principalmente al Dr. Iram Pablo Rodriguez por proporcionarme las herramientas y el apoyo necesario para realizar este trabajo de investigación. Su ejemplo y entrega profesional son una inspiración para seguir creciendo como investigador y como persona.

Agradezco a mi comité de tesis por el enriquecimiento profesional brindado durante el desarrollo de esta investigación.

La Dra. Karina Trujillo de la Universidad Autónoma de Chiapas por la colaboración brindada con las muestras, su atención y su tiempo.

Al M.C. Alfonso Flores por todo el apoyo brindado durante el posgrado.

Mis compañeros de laboratorio Daniel Saldaña y Lulú Ahuja por su apoyo y amistad durante todo este recorrido.

Mi compañero y mejor amigo Gerardo Trujillo (Fi) por que siempre apoyarme, presionarme, estresarme durante todos estos logros que hemos tenido juntos. Gracias fofito.

A mi mejor amiga Ericka Alejos que a pesar de estar lejos siempre me apoyo y me escucho en mis momentos de estrés y locura.

A Jacobo Gálvez Diaz por su apoyo y amor. Por tener fe en mí y ser una inspiración constante en mi vida. Por motivarme a cumplir mis sueños. Gracias por abrir mis alas.

A mis amigos Sergio, Caro, Jackie, Plata y Vero que siempre están apoyándome en todas las decisiones que tomo.

Muchas gracias.

## **DEDICATORIAS**

Este trabajo y cada uno de mis proyectos esta dedicado a mis padres Martha y Roberto, quienes me han apoyado y me han dado todo, quienes me han enseñado a siempre lograr lo que me propongo y siempre luchar por más. Sin su apoyo jamás habría llegado hasta donde estoy y a ser quien soy.

Gracias por siempre confiar en mí.

## INDICE

<b>1. INTRODUCCION</b>	...	<b>1</b>
<b>2. ANTECEDENTES</b>	...	<b>3</b>
2.1 Fiebre chikungunya	...	<b>3</b>
2.2 Chikungunya en el mundo	...	<b>3</b>
2.3 Chikungunya en América	...	<b>3</b>
2.4 Chikungunya en México	...	<b>4</b>
2.5 Agente infeccioso	...	<b>4</b>
2.6 Ciclo de replicación	...	<b>5</b>
2.7 Vectores	...	<b>6</b>
2.8 Aspectos clínicos de la enfermedad	...	<b>7</b>
2.9 Aspectos inmunológicos	...	<b>7</b>
2.10 Polimorfismos genéticos	...	<b>8</b>
2.11 Polimorfismos en genes OAS	...	<b>9</b>
<b>3. JUSTIFICACION</b>	...	<b>13</b>
<b>4. HIPOTESIS</b>	...	<b>14</b>
<b>5. OBJETIVOS</b>	...	<b>15</b>
5.1 Objetivo general	...	<b>15</b>
5.2 Objetivos específicos	...	<b>15</b>
<b>6. MATERIAL Y METODOS</b>	...	<b>16</b>
6.1 Área de estudio	...	<b>16</b>
6.2 Consideraciones éticas	...	<b>16</b>
6.3 Estudio de población y reclutamiento	...	<b>16</b>
6.4 recolección de muestra	...	<b>17</b>
6.5 Diagnostico qRT-PCR y serología	...	<b>17</b>
6.6 Aislamiento de ADN y mediciones espectrofotométricas	...	<b>18</b>
6.7 selección de SNPs	...	<b>18</b>
<b>6.8 genotipificación</b>	...	<b>19</b>
<b>6.9 análisis estadístico</b>	...	<b>19</b>



<b>7. RESULTADOS</b>	...	<b>20</b>
<b>7.1 Datos demográficos</b>	...	<b>20</b>
<b>7.2 Frecuencias alélicas</b>	...	<b>21</b>
<b>8. DISCUSION</b>	...	<b>24</b>
<b>9. CONCLUSION</b>	...	<b>27</b>
<b>10. PERSPECTIVAS</b>	...	<b>28</b>
<b>11. BIBLIOGRAFIA</b>	...	<b>29</b>
<b>12. ANEXOS</b>	...	<b>34</b>

## INDICE DE TABLAS

Tabla 1	SNPs seleccionados y gen correspondiente	18
Tabla 2	Distribución de la población total por sexo	20
Tabla 3	Distribución de la población total por edad	20
Tabla 4	Asociación estadística de los SNPs para los casos chikungunya comparados con los controles.	22
Tabla 5	Distribuciones genotípicas de casos y controles. Valor de referencia para equilibrio de HW ( $p>0.05$ ), EHW (equilibrio de Hardy Weinberg)	23

## INDICE DE FIGURAS

Figura 1	Organización genómica del virus Chikungunya. nsP: proteína no estructural, C: cápside, TF: Proteína transframe, UTR: Regiones no traducibles, ORF: marco abierto de lectura	5
Figura 2	Ciclo de replicación del virus Chikungunya	6
Figura 3	Mapa de distribución global de <i>Ae. aegypti</i> y <i>Ae. albopictus</i> .	7

## ABSTRACT

Arboviruses have become a significant public health problem, with the emergence and re-emergence of arboviral diseases around the world such as dengue, Japanese Encephalitis, West Nile Virus, Zika, yellow fever and chikungunya. CHIKV (chikungunya virus) is transmitted mostly by the bite of the *Aedes aegypti* and *Aedes albopictus* mosquitoes, the most common symptoms of infection are fever and joint pain. The innate immune system is the first line of defense to fight against the virus and initiate the adaptive immune response. Polymorphisms in the genes coding for OAS (oligoadenylate synthetase) genes are known to influence susceptibility and severity of viral diseases. The study aimed to investigate the association of a total of six SNPs located in different regions of the OAS with the predisposition of the disease cause by CHIKV in a cohort of CHIKV infected patients. Polymorphisms in the OAS1 SNPs (rs1131454), OAS2 SNPs (rs1293762, rs15895 and rs1732778) and OAS3 SNPs (rs2285932 and rs2072136) genes were analyzed using PCR followed by restriction fragment length polymorphism methods in 105 patients for chikungunya infection and 82 control group. The SNPs rs1131454, rs1293762, rs2072136 and rs2285932 were found to be highly significant compared to the controls. In addition, there is a database that contains anthropometric information for each patient. The genetic fingerprint in patients associated with CHIKV infection was determined. In the data analyzed, the polymorphisms for the OAS Gene suggest that the variation in this component of the innate immune system could contribute to the response to infections caused by CHIKV

## RESUMEN

Los arbovirus se han convertido en un importante problema de salud pública, con el surgimiento y resurgimiento de enfermedades arbovirales en todo el mundo, como el virus del dengue, encefalitis japonesa, virus del Nilo Occidental, Zika, fiebre amarilla y el chikungunya. El virus chikungunya (CHIKV) se transmite principalmente por la picadura de los mosquitos *Aedes aegypti* (Linnaeus 1762) y *Aedes albopictus*, los síntomas más comunes de infección son fiebre y dolor en las articulaciones. El sistema inmunitario innato es la primera línea de defensa para luchar contra el virus e iniciar la respuesta inmunitaria adaptativa. Se sabe que los polimorfismos en los genes que codifican sintetasas funcionales (*OAS1*, *OAS2* y *OAS3*) influyen en la susceptibilidad y la gravedad de las enfermedades virales. Con base en lo anterior el objetivo del estudio fue evaluar la asociación de seis SNP ubicados en diferentes regiones de la OAS con la predisposición de la enfermedad causada por CHIKV en una cohorte de pacientes infectados por CHIKV. Los polimorfismos en los genes *OAS1* SNP (rs1131454), *OAS2* SNP (rs1293762, rs15895 y rs1732778) y *OAS3* SNP (rs2285932 y rs2072136) se estudiaron mediante PCR tiempo real en 105 pacientes con infección por chikungunya y 82 grupo de control. Para los SNP rs1131454, rs1293762, rs2072136 y rs2285932 se encontró asociación estadísticamente significativa (valor de p) en comparación con los controles. Se determinó la huella genética en pacientes asociados a infección por CHIKV. Los polimorfismos para el Gen OAS sugieren que la variación en este componente del sistema inmune innato podría contribuir a la respuesta a infecciones causadas por CHIKV.

## 1. INTRODUCCIÓN

La fiebre chikungunya es causada por el virus de chikungunya (CHIKV) el cual fue aislado en 1953 en Tanzania, la palabra chikungunya en el idioma makonde significa “el que se encorvar” lo que dar referencia a una de sus principales sintomatologías que es el dolor articular (Schwartz & Albert, 2010). Durante aproximadamente medio siglo han surgido brotes en el continente Africano y asiático pero debido a la ausencia de vigilancia serológica solo se podría estimar el número de personas infectadas (Powers & Logue, 2007). Su reemergencia en 2005 ha causado millones de casos a través del océano Indico y el sur de Asia. Brotes esporádicos aun afectan varios países (Lahariya & Pradhan, 2006). En el 2016 en el continente americano hubo un total de 349 936 casos sospechosos y 146 914 casos confirmados por laboratorio reportados a las oficinas regionales de la PAHO, mitad de lo que hubo el año anterior. Los países que más casos reportaron fueron Brasil, Bolivia y Colombia (WHO, 2019). Este virus de RNA de una sola hebra de sentido positivo perteneciente a la familia togaviridae género alfavirus del cual se conocen 3 cepas “Asian, West African, Central-East African. Es un arbovirus transmitido por los mosquitos *Aedes aegypti* y *Aedes albopictus* (Mardekian & Roberts, 2015). Entre la principal sintomatología causada por la infección y este virus se encuentra fiebre de 39°C, salpullido, artritis y malestar general. Los síntomas se pueden presentar de 3 a 7 días durante la fase aguda de la enfermedad y desaparecen después de dos semanas. Sin embargo, durante la fase crónica la sintomatología es artralgia, fatiga y dolor en las articulaciones que pueden llegar a ser incapacitantes y presentarse durante varias semanas hasta meses (Weaver & Lecuit, 2015). La fisiopatología de la infección por CHIKV y las bases para su severidad son pobremente entendidas. Varios factores de virulencia juegan un rol importante en la causa de enfermedades a humanos. Presentaciones clínicas variadas en la infección por chikungunya podrían ser atribuidas a factores del hospedero y/o mutaciones críticas en el genoma viral. Existen reportes sobre la respuesta inmune innata y adaptativa del hospedero jugando un papel importante en el control de la patogénesis viral de la infección por CHIKV esto ha incrementado un interés por entender el rol de los factores genéticos del hospedero en la patogénesis de enfermedades virales (Kam *et al.*, 2009). Estudios han reportado la asociación entre Alelos de antígenos leucocitarios humanos (HLA) y la consecuencia de la enfermedad (Van Manen *et al.*, 2009).

Los antígenos leucocitarios humanos (HLA) son codificados por la mayoría genes polimórficos que presentan antígenos a CD8+ citotóxicos y Células T auxiliares CD4+. Las moléculas HLA clase II han sido cruciales para desarrollar una respuesta inmune adecuada. Polimorfismos en moléculas HLA de clase II que dan lugar a sustituciones de aminoácidos, determina las especificidades antigénicas de las respuestas inmunitarias del huésped contra la infección. Se ha reportado que los alelos HLA clase II son responsable de la selección de epítomos virales para su presentación a las células T CD4+ que conducen a una respuesta inmunitaria eficaz contra el virus (Thanapati *et al.*, 2014). Dentro de la respuesta inmune del hospedero. El sistema inmune innato es la primera línea de defensa contra los virus e inicia la respuesta inmune adaptativa (Levy & Garcia-Sastre, 2001). El sistema 2'-5'-oligoadenil sintetasa (OAS)/ribonucleasa L (RNase L) es una vía de inmunidad innata que responde a los patógenos y sus moléculas asociadas para inducir la degradación del RNA viral y celular y así bloquea las infecciones virales (Silverman, 2007). OAS es un grupo de enzimas clave en la respuesta inmune innata, que justifica una introducción más amplia al proceso de inmunidad innata. A diferencia del sistema inmunitario adaptativo que responde generando antígeno anticuerpos específicos, la inmunidad innata es una respuesta rápida e inespecífica y es la primera línea de defensa cuando nuestro cuerpo se encuentra con una invasión de patógenos (Ausubel, 2005). Los polimorfismos en los genes que codifican para OAS se conoce que influyen en la susceptibilidad y severidad de las enfermedades virales (Alagarasu *et al.*, 2013). Es probable que las variaciones genéticas de estos genes de la inmunidad innata influyan en la susceptibilidad humana al CHIKV y en el resultado de la progresión de la enfermedad posterior a la infección (Dutta & Tripathi, 2017). En el presente estudio se investigó la posible asociación de 6 SNPs distribuidos en de 3 genes OAS humanos con predisposición a la enfermedad causada por el virus de Chikungunya.

## **2. ANTECEDENTES**

### **2.1. Fiebre chikungunya**

La fiebre por virus chikungunya es una enfermedad reemergente, causada por un virus de ARN. Su nombre proviene del grupo étnico Mokande de Tanzania y Mozambique: significa “Aquel que se encorva”, que hace referencia a la apariencia inclinada que caracteriza a las personas que presentan la enfermedad (Porta, 2012).

### **2.2. Chikungunya en el mundo**

El primer reporte fue en Tanzania en el año 1952 y desde entonces ha sido atribuido a brotes en muchos países, esta geográficamente distribuido en África, sur de Asia e India. Desde que se reportó un brote en Bangkok, Tailandia en 1958, se han reportado otros en Cambodia, Vietnam, Laos, Myanmar, Malasia, Filipinas e Indonesia. Desde enero de 2005 países en el océano Índico están enfrentando brotes de chikungunya, más de un millón de casos han sido reportados (Lahariya & Pradhan, 2006). Brotes de chikungunya han sido documentados anteriormente en países en África, Asia, Europa y océanos Pacífico e Índico. Antes de los casos en San Martín los únicos casos que se encontraban en América era de viajeros o de áreas endémicas conocidas. Ninguno de estos casos resultó de brotes o transmisión local (Fischer & Staples, 2014).

### **2.3. Chikungunya en América**

En diciembre del 2013 se reportó la primera transmisión local en el hemisferio occidental con casos autóctonos identificados en Saint Martín, a partir de ahí se han identificado en 17 países en el territorio caribeño y sudamericano (Anguila, Antigua y Barbuda, Islas Vírgenes Británicas, Dominica, República Dominicana, Guyana Francesa, Guadalupe, Guyana, Haití, Martinica, Puerto Rico, San Bartolomé, Saint Kitts y Nevis, Santa Lucía, San Martín, San Vicente y las Granadinas, Sint Marteen) Para el 30 de Mayo del 2014 ya se sospechaba de 103,018 casos y 4406 estaban confirmados por pruebas de laboratorio. Mas el 95% de los casos reportados pertenecían a República Dominicana (38656 casos), Martinica (30715 casos) Guadalupe (24428 casos) Haití (6318) y San Martín (4113). La mayor incidencia se reportó para San Martín 115 casos por 1000 de población (Fischer & Staples, 2014).



## 2.4. Chikungunya en México

El primer caso reportado en México fue en mayo del 2014 y se dio en una mujer de 39 años con antecedentes de viaje al caribe, regreso a la Ciudad de México presentando los síntomas, pero fue en el estado de Jalisco donde se presentó la mayor parte de la sintomatología (Rivera-Ávila, 2014). El primer caso autóctono se reportó en noviembre de 2014 en el estado de Chiapas en un menor de 8 años (Castillo, 2014). El CENAPRECE informa que para la semana 52 del año 2014 se habían reportado un total de 155 casos en los estados de Guerrero, Chiapas y Oaxaca. El CENAPRECE informa que se encontraron 11577 casos positivos hasta la semana 52 del año 2015, actualmente 28 estados de la república han reportado casos positivos de fiebre por CHIKV. (<http://www.epidemiologia.salud.gob.mx/doctos/boletin/2015/sem52.pdf>)

El CENAPRECE reporta que durante el año 2018 se reportaron un total de 39 casos, para el 2019 el reporte fue de 9 casos mientras que para el 2020 solamente hubo un total de 7 casos y finalmente durante el año 2021 el total reportado fue de 4 casos. (<https://www.gob.mx/salud/documentos/boletinepidemiologico-sistema-nacional-de-vigilancia-epidemiologica-sistema-unico-de-informacion-261547>)

## 2.5. Agente infeccioso

El virus de chikungunya pertenece al género alfavirus y la familia togaviridae, que es transmitido por vector. Así mismo es causante de fiebre aguda y dolores esquelético-musculares agudos en humanos. Como miembro de los alfavirus su tamaño es pequeño 60-70nm de diámetro, es esférico, encapsulado, RNA de una cadena positivo y mide 11.8 kb (Solignat *et al.*, 2009). Como se observa en la figura 1 se compone de 2 grandes marcos abiertos de lectura (ORFs) que codifican para proteínas estructurales y no estructurales (Strauss *et al.*, 1984). ORF1 tiene 7422 nucleótidos (nt) de largo que codifican para 4 poliproteínas no estructurales, nsP1- nsP4 con 535,798,530 y 611 aminoácidos respectivamente (Schuffenecker *et al.*, 2006). Además, tiene 6 proteínas estructurales codificadas por ORF 2 el cual tiene una longitud de 3744 nt. Esas proteínas incluyen glicoproteínas de envoltura, E1 de 439 aminoácidos y E2 con 432 aminoácidos; una proteína de cápside de 261 aminoácidos (Schuffenecker I, et al; 2006) y 3 proteínas asociadas E3 de

64 aminoácidos de longitud, Proteína 6K con 61 aminoácidos y la proteína transmarco además de proteínas estructurales la proteína E1 es comúnmente utilizada para el análisis filogenético de CHIKV y para la determinación de su genotipo (Firth AE, et al; 2008). Es esencial además el estudio de las regiones no traducibles, uniones y otros componentes estructurales por que contribuyen al cambio en las estructuras secundarias de RNA (Schuffenecker *et al.*, 2006). El genoma del virus chikungunya tiene una estructura 5' cap y una cola 3' poly (A). Adicionalmente tiene 2 regiones no traducibles (UTRs) en las secuencias proximales 5'y 3'. La región de unión está localizada entre ORF1 y ORF2, y es una región no codificante. La 5' UTR está compuesta de 76 nucleótidos y la 3'UTR de 526 nucleótidos (Khan *et al.*, 2002). Existen 3 grupos filogenéticos con diferentes propiedades antigénicas, el genotipo asiático, el genotipo de África del oeste y el del este, centro y sur de África (Díaz-Quñonez *et al.*, 2015).

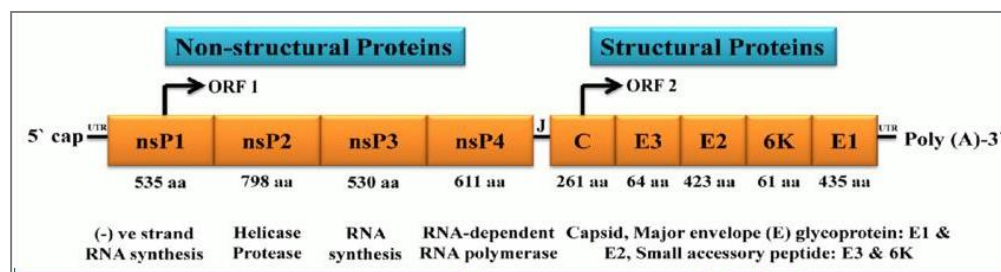


Figura 1.- Organización genómica del virus Chikungunya. nsP: proteína no estructural, C: cápside, TF: Proteína transframe, UTR: Regiones no traducibles, ORF: marco abierto de lectura (Jain *et al.*, 2017).

## 2.6. Ciclo de replicación

El virus entra en la célula blanco por medio de endocitosis. Algunos receptores se implican en el proceso, sin embargo, sus roles precisos no han sido establecidos. Como se ejemplifica en la figura 2 siguiendo la endocitosis el ambiente ácido de las endosomas dispara cambios conformacionales en la envoltura del virus y expone el péptido E1, que media la fusión en la membrana del virus y la célula hospedera. Esto permite la entrega citoplásmica del núcleo y libera el genoma del virus. Dos precursores de proteínas no estructurales (nsPs) se traducen del mRNA y la escisión de estos precursores genera nsP1-nsP4. nsP1 interviene en la síntesis de la cadena negativa de RNA viral y tiene propiedades capping. nsP2 presenta las actividades de RNA helicasa, RNA trifosfatasa and proteinasa y está envuelta en el paro de

la transcripción de la célula hospedera. nsP3 es parte de la unidad de replicasa y nsP4 es la RNA polimerasa viral. Estas proteínas se ensamblan para formar el complejo de replicación, que sintetiza una cadena negativa completa de RNA intermediario. Esto funciona como el templado para la síntesis de los dos RNA subgenómicos (26S y 49S). El RNA subgenómico conduce a la expresión de la poliproteína precursora C-pE2-K-E1, que es procesada por una proteasa de serina autoproteolítica. La capsida se libera y la pE2 y la glicoproteína E1 son generadas por el siguiente proceso. pE2 y E1 se asocian en el complejo de Golgi y son exportadas a la membrana plasmática, donde pE1 se adhiere a la E2 y E3. El ensamblaje viral es promovido por los enlaces de la nucleocapside viral al RNA viral y el reclutamiento de las glicoproteínas de envoltura asociadas a membrana. El ensamblaje de la partícula de virus con el núcleo icosaédrico brota en la membrana celular (Schwartz & Albert, 2010).

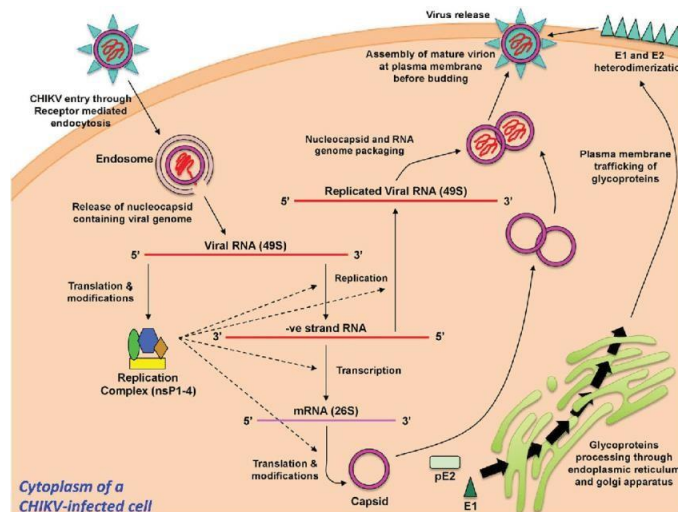


Figura 2.- Ciclo de replicación del virus Chikungunya (Elaiw *et al.*, 2018).

## 2.7. Vectores

*Aedes aegypti* y *Ae. albopictus* son los principales vectores de virus que causan enfermedades. Los virus se transmiten a humanos por medio de la picadura de la hembra infectada que anteriormente se alimentó de una persona que padecía la infección. Dentro del mosquito, el virus infecta el intestino medio y subsecuente se disemina a las glándulas salivales en un periodo de alrededor de 8-12 días. Después de este periodo de incubación el virus puede ser transmitido a los humanos. Los estadios inmaduros se encuentran en hábitats con residuos de agua, mayormente en contenedores artificiales (OMS, 2018). Se encuentran ampliamente

distribuidos en zonas tropicales *Ae. aegypti* es principalmente una especie antropogénica y en cuanto a *Ae. albopictus* es principalmente silvestre, pero ha comenzado a adaptarse al ambiente rural, sub-urbano y urbano de los humanos. En décadas recientes *Ae. albopictus* se ha dispersado desde Asia hasta África, América y Europa con ayuda del comercio internacional de plantas usadas donde los mosquitos ovipositan como podemos observar en el mapa de distribución en la figura 3. Los huevos pueden resistir condiciones de desecación y permanecer viables por varios meses en la ausencia de agua. (OMS, 2018)



Figura 3. Mapa de distribución global de *Ae. aegypti* y *Ae. albopictus*. (Kraemer *et al.*, 2015).

## 2.8. Aspectos clínicos de la enfermedad

La enfermedad causada por el virus Chikungunya se divide en aguda, subaguda y crónica. La fase aguda dura de 3-10 días con artralgia en el 87% de los casos, dolor de espalda 67% de los casos y cefalea en el 62% de los casos. Los síntomas desaparecen de 1-3 semanas, sin embargo, algunos pacientes pueden sufrir una recaída de los síntomas reumatológicos en los meses después de la enfermedad aguda. La fase subaguda dura de 11-90 días y se presentan recaídas clínicas en el segundo y tercer mes con artralgias inflamatorias persistentes, en el carpo y metacarpo, falángicas múltiples, alteraciones vasculares periféricas, fatiga y depresión. La fase crónica dura más de 90 días con la presencia de los síntomas. (<http://www.epidemiologia.salud.gob.mx/doctos/boletin/2014/sem36.pdf>)

## 2.9. Aspectos inmunológicos

Cuando existe una infección por un virus, el sistema inmune como respuesta produce citoquinas antivirales. El interferón (IFN) es la citoquina antiviral más potente, la cual a su

vez induce genes estimulados por el interferón (conocido por sus siglas en inglés como ISGs), los cuales son responsables de mediar las funciones efectoras antivirales (Choi *et al.*, 2015). El Interferón tipo I, principalmente IFN- $\alpha$  /  $\beta$ , producido por células infectadas por virus, induce la expresión de más de cuatrocientos genes estimulados por el interferón (ISG), cuyos productos trabajan entre sí para inducir un estado antiviral. Una de las vías inducidas por el interferón responsables de la actividad antiviral es la vía 2', 5' -oligoadenilato sintetasa (Zhao *et al.*, 2012). Entre las proteínas inducidas por IFN, las proteínas oligoadenilato sintasa (OAS) se han identificado como enzimas que detectan a los ácidos nucleicos exógenos e inician rutas antivirales. La enzima OAS oligomerizada genera el oligoadenilato 2'-5'-ligado, también conocida como 2-5A (Choi *et al.*, 2015). Se cree que la concentración de 2-5A es el factor principal que controla la activación de la RNasa L. Después de la expresión de 2-5a generado por la activación de OAS, la RNasa L corta las regiones monocatenarias del ARN mensajero (ARNm) viral y celular, lo que conduce a la inhibición de la síntesis de proteínas víricas, así como la suspensión de la replicación viral (Zhao *et al.*, 2012). La ribonucleasa L al ser activada por OAS puede tomar diversos caminos según el sustrato de RNA que detecte, variaran los efectos antivirales. En el caso de que el sustrato sea ARN viral genómico (de virus de RNA de cadena sencilla) el efecto será la eliminación del genoma vírico; en caso de detectar ARN mensajero (ARNm), su resultado será una inhibición de la síntesis de proteínas virales; en tercer instancia dado que el sustrato sea ARNm o ARN ribosomal (ARNr) celular, su efecto será un daño a la maquinaria celular del huésped requerida para la replicación viral; en un cuarto caso en caso de que el sustrato sea el ARN del huésped y no del propio ARN del virus, se producirán small dúplex ARNs los cuales inducirán a su vez al interferón beta; y finalmente si el sustrato es ARNr u otro, se eliminara la célula infectada por virus por apoptosis (Silverman, 2007).

## **2.10. Polimorfismos genéticos**

Un polimorfismo genético es la presencia en la misma población de dos o más alelos en un locus, con una frecuencia apreciable, donde la frecuencia mínima generalmente es el 1% (Cavalli-Sforza, 1973). La evidencia sobre el rol que juegan los genes se ha acumulado en investigaciones de variaciones inter-individuales en susceptibilidad para enfermedades infecciosas. En estudios de los genes de los hospederos con relación a enfermedades

infecciosas se han podido identificar una variedad de asociaciones genéticas implicadas en las vías moleculares involucradas en la patogénesis de la enfermedad (Nguyen & Kenji, 2011). Se han documentado estudios sobre la influencia que tienen estos polimorfismos con la susceptibilidad de contraer alguna enfermedad o mostrar cierta sintomatología, En Tailandia se reportó sobre una fuerte asociación entre un polimorfismo en promotor de CD209, DCSIGN1-336 y el riesgo de la fiebre de dengue comparada con dengue hemorrágico. Este polimorfismo estaba asociado con una fuerte protección hacia la fiebre dengue. Indicando que CD209 tiene un rol crucial en la patogénesis del virus dengue (Sakuntabhai *et al.*, 2005). En el año 2010 en Cuba se reportó que en el gen específico FC $\gamma$ RIIa (CD32) contiene una variable polimórfica (H/R131) que está asociada a la reducción de desarrollar dengue hemorrágico (García *et al.*, 2010) En ese mismo año se identificaron genes asociados con las presentaciones clínicas de dengue, de 50 casos probables de dengue hemorrágico, 236 de fiebre por dengue y 236 infecciones asintomáticas se genotipificaron 593 polimorfismos de un solo nucleótido en 56 genes en el interferón de vía de respuesta 1 así como otros genes candidatos importantes, encontraron que existe una relación entre dengue hemorrágico y el gen JAK1 (Silva *et al.*, 2010). En el año 2016 se evaluaron polimorfismos en marcadores pro y antiinflamatorios, se analizaron 80 pacientes diagnosticados con dengue, 100 con sintomatología similar pero negativos a dengue y con 99 personas sanas, se buscaron polimorfismos en 10 genes asociados sin embargo no existió diferencia significativa entre los 3 grupos (Feitosa *et al.*, 2016).

### **2.11. Polimorfismos en genes OAS**

Los genes en la familia OAS, están compuestos por los genes: *OAS1*, *OAS2*, *OAS3* y una proteína similar a *OAS* (*OASL*). Los genes que codifican las proteínas *OAS* están agrupados en el cromosoma 12 (en la región 12q24.1) en humanos (Choi *et al.*, 2015).

El SNP RS1131454 del gen *OAS1* está localizado en el cromosoma 12:113348870 en donde el nucleótido ancestral es G y su ambigüedad en el código es N, es decir que cualquiera de los nucleótidos puede estar asociado con este polimorfismo, donde el nucleótido menormente encontrado es A, en donde su MAF (frecuencia de alelo menor) es de 0.47. La consecuencia más severa de dicho cambio es una mutación con cambio de sentido, variante en la cual se

cambian una o más bases, dando como resultado una secuencia diferente de aminoácidos, pero con la misma longitud. Esta mutación se encuentra presente en un 47% de la población mundial, siendo la población americana la más afectada (63%), dicho cambio en la población Mexicoamericana se encuentra con una incidencia del 65% (1000 Genomes Project Consortium, 2015).

El segundo SNP del gen OAS1 (RS10774671) está localizado en el cromosoma 12:113357193 en donde el nucleótido ancestral es G, en donde su cambio de nucleótido puede ser R, es decir que puede ser cualquier purina (A o G), en donde su MAF es de 0.39 para G. La consecuencia más severa es un cambio en el sitio de empalme, mutación genética que inserta, elimina o cambia una cantidad de nucleótidos en el sitio específico en el que tiene lugar el corte y el empalme durante el procesamiento del ARN mensajero precursor a ARN mensajero maduro. La mutación de G por A se encuentra presente en un 61% de la población a nivel mundial, siendo la población del este de Asia la más afectada con 75%, en seguida con un 73% se encuentra la americana y con este mismo porcentaje de cambio se encuentra la población Mexicoamericana (1000 Genomes Project Consortium, 2015).

Ahora bien, el primer SNP del gen OAS2 (RS1293762) está localizado en el cromosoma 12: 113430836 en donde el nucleótido ancestral es T y su ambigüedad en el código es K, es decir nucleótidos que contengan el grupo cetona (G o T), donde su MAF es de 0.23 para T. En este polimorfismo su consecuencia más severa es una variante en el intrón, lo que podría afectar la expresión del gen al introducir sitios de empalme nuevos o al activar promotores nuevos. Dicho SNP se encuentra en un 77% de la población mundial siendo la población del este de Asia la más afectada con un 93% de mutación para G, mientras que en el caso de la americana dicho cambio se presenta en un 72%, de esta la población Mexicoamericana presenta un 76% de predisposición (1000 Genomes Project Consortium, 2015).

El siguiente polimorfismo del gen OAS2 es el RS15895 el cual está localizado en el cromosoma 12: 113448288 en el cual cuyo nucleótido ancestral es A y su ambigüedad en el nucleótido es R, es decir que el cambio puede ser cualquier purina (A o G), donde su mínima frecuencia para el alelo A es de 0.14. La consecuencia más severa encontrada es la pérdida del codón de paro, dicha mutación resulta en la pérdida de este codón lo que da origen a un transcrito mucho más grande de lo normal. El cambio de A por G en este polimorfismo se

encuentra en un 86% de la población mundial siendo el este de Asia la población predominante para el alelo contrario al ancestral con un 100%, mientras que en la población americana dicho cambio solo se presenta en un 78% y específicamente en la población Mexicoamericana dicho cambio se reportó en un 79% (1000 Genomes Project Consortium, 2015).

En el caso del último SNP del gen OAS2, RS1732778, dicho polimorfismo está ubicado en el cromosoma 12:113456925 en el cual su alelo ancestral es G, con una ambigüedad en este alelo de R, cambio por cualquier purina como ya se mencionaba, donde la frecuencia del alelo menor es de 0.27 para A. La consecuencia más severa reportada es una variante en el gen río arriba, es decir una variante en la secuencia localizada en el lado 5' del gen. El cambio de G por A se encuentra en un 27% de la población mundial, siendo la población del este de Asia la más afectada por este cambio con un 48%, mientras que en el caso de la población americana dicho cambio se encuentra en un 23% y de forma más específica en el caso de la población Mexicoamericana dicho cambio se encuentra en un 27% (1000 Genomes Project Consortium, 2015).

El rs2285932 es el primer SNP del gen OAS3, se localiza en el cromosoma 12:113386950 en donde su nucleótido ancestral es C, en dicha posición existe una ambigüedad en el código representada por Y, es decir que esta posición puede ser ocupada por cualquier pirimidina (C o T), donde su MAF es de 0.16 para T. Una de las consecuencias reportadas debido a dicho cambio es una variante sinónima, inofensiva dado a que no afecta la secuencia de aminoácidos, sin embargo, existen variantes en las cuales el transcrito no es codificante, mutación que es el resultado de un RNA que no es traducido a proteína. El cambio de nucleótidos C por T se da en un 16% de la población a nivel mundial, donde la población europea es la más propensa a presentar dicho cambio con un 33%, en lo que respecta a la población americana esta presenta un 20% para dicho cambio, en donde en la población Mexicoamericana presenta un 17% de probabilidad para dicho polimorfismo (1000 Genomes Project Consortium, 2015).

El segundo polimorfismo abordado del gen OAS3 (RS2072136) se localiza en el cromosoma 12:113398919 en donde su nucleótido ancestral es G, esta posición presenta una ambigüedad en el código de R, donde su MAF es de 0.32 para A. En la cual una de las consecuencias



dadas a este cambio es una mutación sinónima, la cual es inofensiva, sin embargo, existen cambios más peligrosos reportados, como variantes en el exón que da un transcrito no codificante. El SNP de G por A está presente en un 32% de la población mundial, siendo la población del este de Asia la más propensa (66%). A diferencia de la población americana la cual presenta este cambio en un 28% de la población analizada, mientras que en la población Mexicoamericana esta mutación se ha visto presente en un 38% (1000 Genomes Project Consortium, 2015).

El polimorfismo perteneciente al gen OAS3 RS61942233 localizado en el cromosoma 12:113403675 en donde su nucleótido ancestral es C, con una ambigüedad en el código de Y, cualquier pirimidina, donde su frecuencia del alelo menor es 0.01 para T. La consecuencia más severa de dicho cambio es la ganancia de un codón de paro, lo que genera un transcrito recortado y, por ende, no funcional. El cambio de C por T ocurre en 1% de la población, en donde las poblaciones europeas, del sur de Asia y americanas son las afectadas con este mismo porcentaje de incidencia, en donde la población Mexicoamericana no es la excepción (1000 Genomes Project Consortium, 2015).

### 3. JUSTIFICACIÓN

La infección por el virus Chikungunya genera una enfermedad reumática debilitante que puede llegar a persistir meses inclusive años. El sistema inmunitario innato es la primera línea de defensa para luchar contra el virus e iniciar la respuesta inmunitaria adaptativa del hospedero la cual juega un papel importante en el control de la patogénesis viral de la infección por CHIKV esto ha incrementado un interés por entender el rol de los factores genéticos del hospedero en la patogénesis de enfermedades virales. Los polimorfismos en los genes que codifican para OAS se conoce que influyen en la susceptibilidad y severidad de las enfermedades virales. Es probable que las variaciones genéticas de estos genes de la inmunidad innata influyan en la susceptibilidad humana al CHIKV y en el resultado de la progresión de la enfermedad posterior a la infección. En el presente estudio se investigó la posible asociación de 6 SNPs distribuidos en de 3 genes OAS humanos con predisposición a la enfermedad causada por el virus de Chikungunya.

#### **4. HIPÓTESIS**

Existen polimorfismos genéticos en el humano asociados a la susceptibilidad por la infección causada por CHIKV.

## **5. OBJETIVOS**

### **1.1. Objetivo general**

Determinar la presencia de polimorfismos humanos asociados a la susceptibilidad por infección de virus chikungunya.

### **1.2. Objetivos específicos**

- Asociar los SNP rs1131454, rs15895, rs1732778, rs1293762, rs2072136, rs2285932 con la susceptibilidad a infección por CHIKV
- Determinar la probabilidad de factor de riesgo de cada uno de los SNPs.
- Correlacionar los síntomas con la batería de polimorfismos

## **6. MATERIAL Y MÉTODOS**

### **6.1. Área de estudio**

Se realizó un estudio transversal y observacional entre diciembre de 2014 y junio de 2015 en el Hospital Clínico “Dr. Roberto Nettel Flores” ubicado en la ciudad de Tapachula (14°56' N, 92°17 'W), estado de Chiapas, cerca de 15 km de la frontera México-Guatemala.

### **6.2. Consideraciones éticas**

El estudio fue realizado de acuerdo con la declaración de Helsinki, y el proyecto fue realizado en colaboración con la Universidad Autónoma de Chiapas (UNACH), por lo que fue evaluado y registrado ante la Dirección General de Investigación y Posgrado de la UNACH (Project#03/MHT/RPR/088/17). Durante el brote epidémico del periodo diciembre 2014 a abril 2015 se incluyeron sujetos con un cuadro febril como probable caso de fiebre por CHIKV, siguiendo la definición operacional de la Secretaría de Salud e inicio de la enfermedad en los primeros 7 días. Los pacientes fueron reclutados en la C.H. ISSSTE en Tapachula, Chiapas; que presta servicio de salud a la Región Soconusco del estado de Chiapas. Se recogieron muestras de sangre como parte del análisis de laboratorio de rutina de los pacientes ingresados en el Hospital Dr. Roberto Nettel Flores. Por lo tanto, solo se obtuvo un consentimiento oral para participar en el estudio de cada paciente. Toda la información pertinente sobre el estudio (propósito, procedimientos, riesgos, beneficios, alternativas a la participación, etc.) se explicó a los posibles participantes en presencia de un testigo independiente, y cada paciente que accedió a participar fue registrado en un formulario de admisión por el Departamento de Epidemiología del hospital.

### **6.3. Estudio de población y reclutamiento**

Se reclutó un total de 187 pacientes, de los cuales 105 estarían infectados por CHIKV y 82 fueron controles, 124 eran mujeres y 63 hombres. Los pacientes que ingresaron en este hospital fueron incluidos en el estudio si sus síntomas clínicos cumplían con los siguientes criterios de inclusión para sospecha de CHIKF: inicio agudo de fiebre  $> 38.5^{\circ} \text{C}$  acompañado de artralgia severa no explicada por otras condiciones médicas en pacientes que residen en la

epidemia zona. Los criterios de exclusión eran si los pacientes no estaban de acuerdo en participar en el estudio o si eran positivos para DENV por RT-PCR o ELISA.

#### **6.4. Recolección de muestra**

El médico llenó el estudio de caso por paciente y luego recolectaron tres muestras de sangre de cada paciente: un tubo con EDTA para un conteo completo de células sanguíneas, un tubo con citrato y un tubo seco para las pruebas de laboratorio restantes. Los tubos secos se centrifugaron a 3.000 rpm y el suero se dividió en alícuotas y se almacenó a -80 ° C hasta su uso.

#### **6.5. Diagnóstico qRT-PCR y serología**

El RNA se extrajo de 140 µL de suero de cada muestra utilizando el Mini Kit de RNA Viral QIAmp1 (Qiagen, Hilden, Germany) de acuerdo con el protocolo del fabricante. Para el diagnóstico molecular, se realizó One Step qRT-PCR de acuerdo con el protocolo del Centro de Control de Enfermedades (CDC) utilizando cebadores y una sonda diseñada para el linaje caribeño (genotipo asiático): 1) se utilizaron los cebadores CHIK 856 5'-ACCATCGGTGTTCCATCTAAAG-3' y CHIK 962c 5'-GCCTGGGCTCATCGTTATT-3' y la sonda TaqMan CHIK 908 5'-FAMACAGTGGTTTCGTGTGAGGGGCTAC-NFQ-3'; 2) la qRT-PCR se preparó con el kit QIAGEN QuantiTect Probe RT-PCR1 (Qiagen, Venlo, Netherlands) de acuerdo a las instrucciones del fabricante, agregando 10 µL de muestra de ARN por reacción por duplicado; y 3) las muestras se procesaron en la plataforma 7500 Fast Real Time PCR System (Applied Biosystems, Foster City, CA). Las condiciones del ciclo de amplificación fueron: un ciclo de 50 ° C durante 30 minutos y 95 ° C durante 15 minutos seguido de 45 ciclos de 95 ° C durante 15 segundos y 60 ° C durante 60 segundos. El valor del umbral del ciclo (Ct) fue 38: los resultados se consideraron positivos si el valor Ct era <38 ciclos en ambos pocillos; negativo si se necesitaban más de 38 ciclos en ambos pozos, y erróneo si solamente se obtenía el valor de Ct. Las muestras de suero se seleccionaron para detectar anticuerpos IgM anti-CHIKV mediante un ensayo inmunoabsorbente ligado a enzimas (ELISA) utilizando el kit CHIK Detect MAC-ELISA (InBios, Inc., Seattle, WA). Todas las muestras se analizaron por duplicado y cualquier muestra no concluyente se volvió a analizar.

## 6.6. Aislamiento de ADN y mediciones espectrofotométricas

Se extrajo ADN de muestras de sangre anticoaguladas de los pacientes y controles sanos utilizando el kit QIAamp DNA Blood Midi (Qiagen) siguiendo las instrucciones del fabricante. La calidad del ADNg extraído por los diferentes métodos se evaluó mediante espectrometría (Nanodrop; Thermo Scientific). La relación de absorbancia a 260 nm y 280 nm se utilizó para evaluar la contaminación con proteínas, mientras que la relación de absorbancia a 260 nm y 230 nm se calcula para evaluar la contaminación con fenoles, compuestos aromáticos, péptidos y carbohidratos. Ambas mediciones del espectrofotómetro constituyeron los criterios para la evaluación de la calidad del ADNg con valores más altos asociados con una mejor cantidad y pureza del ADNg. El ADNg con una relación A260 / 280 nm entre 1,8 y 2,0 se considera puro.

## 6.7. Selección de SNPs

Como se indicó anteriormente, las variantes genéticas humanas pueden influir en la susceptibilidad a las enfermedades infecciosas. Se han identificado asociaciones entre polimorfismos genéticos y susceptibilidad a enfermedades infecciosas como la hepatitis B y C, la malaria, la tuberculosis, el VIH-1, Virus del Oeste del Nilo y Dengue. En la siguiente tabla 1 se muestra los SNP seleccionados y su gen correspondiente.

Tabla 1. SNPs seleccionados y gen correspondiente

Gen	SNP
OAS 1	rs1131454
OAS2	rs15895
	rs1732778
	rs1293762
OAS3	rs2072136
	rs2285932

Debido a esta asociación, los SNP anteriormente mencionados son de interés en este análisis.

## **6.8. Genotipificación**

Para la genotipificación, se colocaron 10 ng de ADN en 5  $\mu$ L de MasterMix de rhAmp™ SNP Assays (Tecnología de ADN integrada) en placas de 48 pocillos y se procesaron usando el Sistema de PCR en tiempo real StepOne™ (Thermo Fisher Scientific). Utilizando los fluoróforos FAM y Yakima Yellow, siguiendo el protocolo establecido, un ciclo de 95 ° C durante 10 minutos seguidos de 45 ciclos de 95 ° C durante 10 segundos, 60 ° C durante 30 segundos y 68 ° durante 20 segundos, finalmente 99 ° durante 15 minutos. El genotipo de cada muestra se determinó visualizando las gráficas de discriminación alélica y las gráficas de amplificación usando un software en el sistema de PCR en tiempo real StepOne™ (Thermo Fisher Scientific).

## **6.9. Análisis estadístico**

La asociación de las frecuencias alélicas de los polimorfismos de OAS entre el grupo clínico y el grupo control se determinó calculando el odds ratio (OR) derivado de la prueba de Chi2. La significancia estadística se determinó en  $p < 0.05$  usando el programa estadístico IBM SPSS, el equilibrio de Hardy-Weinberg se calculó usando una calculadora en línea.



## 7. RESULTADOS

### 7.1. Datos demográficos

Los datos demográficos del total de toda la población fueron analizados utilizando Microsoft Excel. Las muestras fueron ordenadas por edad, sexo, casos y controles (Tabla 2). Se analizaron un total de 187 pacientes, de los cuales 105 fueron pacientes infectados con CHIKV y 82 los controles. Los pacientes 72 mujeres, que representa el 68.5% de la población de casos y 33 hombres que representan el 31.4%. En el grupo control con 52 mujeres representando el 63.41% y 30 hombres que representa el 36.58%.

Tabla 2. Distribución de la población total por sexo

Información de la población	Control (%)	Casos (%)	Total (%)
Sexo			
Mujer	52 (63.41)	72 (68.57)	124 (66.31)
Hombre	30 (36.58)	33 (31.42)	63 (33.68)
Total	82	105	187

La población se dividió en grupos de edad, con el grupo en el rango de 31-40 años con mayor cantidad de personas en casos y controles (Tabla 3).

Tabla 3. Distribución de la población total por edad

Información de la población	Control (%)	Casos (%)	Total
Edad			
0-20	10 (12.19)	9 (8.5)	19
21-30	9 (10.97)	16 (15.2)	25
31-40	18 (21.95)	21 (20)	39
41-50	24 (29.26)	33 (31.42)	57

>50	21 (25.60)	26 (24.78)	47
Total	82	105	187

## 7.2. Frecuencias alélicas

Para determinar la asociación de los SNPs del gen OAS con la susceptibilidad o protección frente al CHIKV, se analizaron las frecuencias genotípicas y alélicas de 6 SNP [OAS1 (rs1131454), OAS2 (rs15895, rs1732778, rs1293762) y OAS3 (rs2072136, rs2285932)]. La frecuencia de la distribución del genotipo de los pacientes y controles de chikungunya se describe en la Tabla 4. Se observó un aumento significativo en el grupo control para el alelo alternativo AA (55.7%) en comparación con el grupo infectado para rs1131454 ( $p = 0.032$ ). Cuando la comparación del genotipo de referencia GG con GA (OR = 0.57, IC 95% 0.24-1.02) y AA (OR = 5.57, IC 95% 0.66-47.22) muestra una asociación con CHIKV, sin embargo, no fue posible asociarse como protector o factor de susceptibilidad. En cuanto al SNP rs15895, no se encontró diferencias en las frecuencias para los grupos de alelos en los casos con respecto a los controles, así mismo no se encontraron diferencias significativas para este SNP. Para el SNP rs1732778, se observó una frecuencia aumentada en el alelo alternativo AA (48.6%) en el grupo infectado con respecto al grupo control (34.1%), sin embargo, tampoco muestra una diferencia significativa entre ambos grupos. Con respecto al SNP rs1293762, se encontró una diferencia altamente significativa ( $p = 0.000$ ) entre ambos grupos, un aumento de la frecuencia en el alelo alternativo CC (81%, OR = 4.51, IC 95% 1.11-18.29) en los casos con respecto al grupo control que, en comparación con los otros genotipos, puede asociarse como protector para el CHIKV. Para los SNP rs2072136 y rs2285932 se no se observó diferencias en las frecuencias alélicas para el grupo infectado con respecto al grupo control, igualmente, no se obtuvo una diferencia significativa entre ambos grupos. Para evaluar la diferencia significativa entre las frecuencias genotípicas observadas y lo esperadas-se realizó la prueba de chi-cuadrado.

Tabla 4. Asociación estadística de los SNPs para los casos chikungunya comparados con los controles.

Gen	SNP	Genotipo	Casos (%)	Control (%)	p-Value (0.05)	OR	95% CI
OAS 1	rs1131454	GG	7 (6.7)	1 (1.2)	<b>0.011</b>	1	1
		GA	23 (21.9)	32 (39)		0.1	0.01-0.89
		AA	75 (71.4)	49 (59.8)		0.22	0.03-1.83
	rs15895	TT	1 (1.0)	0 (0.0)	0.729	-	-
		TC	15 (14.3)	9 (11.0)		-	-
		CC	89 (84.8)	73 (89.0)		-	-
OAS 2	rs1732778	GG	35 (33.3)	31 (37.8)	0.106	1	1
		GA	19 (18.1)	23 (28.0)		0.73	0.34-1.59
		AA	51 (48.6)	28 (34.1)		1.61	0.83-3.15
	rs1293762	AA	3 (2.9)	7 (8.5)	<b>0.000</b>	1	1
		AC	17 (16.2)	31 (37.8)		1.28	0.29-5.60
		CC	85 (81.0)	44 (53.7)		<b>4.51</b>	<b>1.11-18.29</b>
OAS 3	rs2072136	GG	29 (27.6)	24 (29.3)	0.123	1	1
		GA	35 (33.3)	37 (45.1)		0.78	0.38-1.59
		AA	62 (33.2)	21 (25.6)		1.62	0.76-3.44
	rs2285932	TT	3 (2.9)	4 (4.9)	0.428	1	1
		TC	8 (7.6)	10 (12.2)		1.07	0.18-6.21
		CC	94 (89.5)	68 (82.9)		1.84	0.40-8.50

Las distribuciones genotípicas de los casos y controles en los SNP rs1732778 y rs2285932 se mantuvieron constantes como se observa en la Tabla 4 ( $p > 0.5$ ,  $\chi^2 = 3.84$ ) en cambio para rs1131454 se obtuvo una  $p=0.011$  en casos y una  $p=0.08$  en los controles, así como para rs15895 se resultó obtener una  $p=0.682$  en casos y  $p=0.599$  para el grupo control, se obtuvieron resultados similares para rs1293762 donde  $p=0.081$  para casos y  $p=0.646$  en el grupo control. Finalmente, para rs2072136 solamente el grupo control presentó discrepancias  $p=0.382$ . Las posibles razones de estas discrepancias serán resaltadas en la sección de discusión.

Tabla 5. Distribuciones genotípicas de casos y controles. Valor de referencia para equilibrio de HW ( $p > 0.05$ ), EHW (equilibrio de Hardy Weinberg)

Gen	SNP	pEHW Casos	pEHW Control
OAS 1	rs1131454	<b>0.011</b>	<b>0.08</b>
OAS2	rs15895	<b>0.682</b>	<b>0.599</b>
	rs1732778	0.000	0.000
	rs1293762	<b>0.081</b>	<b>0.646</b>
OAS3	rs2072136	0.000	<b>0.382</b>
	rs2285932	0.000	0.000

## 8. DISCUSIÓN

Los datos epidemiológicos muestran que la población femenina resulto ser más susceptible a la infección con el virus de chikungunya que la población masculina. Aun cuando el tamaño de la muestra no es grande la población femenina corresponde a un 68.5% que coinciden con el porcentaje reportado por Danis-Lozano (2015) donde la población femenina era aproximadamente el 70% de los pacientes. En el mismo año Nava-Frías et al (2015) reportaron que el número de casos en mujeres correspondía a un 65%, similarmente Garay-Moran et al (2017) reportan el predominio del sexo femenino con un 64% de la población y para nuestro estudio corresponde a un 68.5% de la población. Las mujeres han sido notablemente más afectadas que los hombres esto podría deberse a cuestiones culturales como trabajar en casa que es en donde se encuentra presente el principal vector (Nava-Frías, *et al.*, 2015) En cuanto a la distribución por edad se obtuvo que el grupo más afectado fue de 41-50 años representando un 31.42 % de la población coincidiendo con lo reportado por Danis-Lozano, a diferencia de Nava-Frías y Garay-Moran para quienes el grupo más vulnerable resulto ser el de 25-35 años de edad. Las frecuencias alélicas observadas fueron comparadas con la base de datos de 1000 genomes Project (CONSORTIUM, Genomes Project, 2015). La comparación entre la base de datos y los resultados obtenidos reveló similitud en las frecuencias observadas en este trabajo así como las que se encuentran en la base de datos, a excepción de los SNP rs1732778 y rs 2072136 que no siguen la tendencia alélica de la base de datos, en donde se indica para rs1732778 que la frecuencia del alelo G debería ser mayor que la del alelo A, sin embargo no se presenta de esa manera ya que la frecuencia de los alelos G y A son de 46.52% y 53.48% respectivamente indicando una distribución similar en ambos alelos. Para el SNP rs 2072136 se observa que la tendencia en la base de datos indica que el alelo G presenta mayor frecuencia al alelo A y no coincide con los resultados obtenidos para esta población donde el alelo G representa el 47.59% y el alelo A el 52.41% de igual manera indicando una distribución similar en ambos alelos.

Para la determinación de la asociación de un grupo de polimorfismos en los genes que codifican para OAS, una cohorte de pacientes con antecedentes clínicos de CHIKV se comparó con un grupo de control. Los polimorfismos genéticos han estado proporcionando pistas importantes sobre la capacidad del hospedero para tratar con éxito diversas infecciones.

Los resultados demostraron diferencias significativas en las frecuencias alélicas de dos polimorfismos del grupo de genes OAS entre el paciente y el grupo de control; Los SNP (rs1131454 y rs1293762). La familia de genes humanos de la OAS comprendía cuatro genes denominados OAS1, OAS2, OAS3 y similares a OAS (OASL), ubicados en el cromosoma 12 (Hovanessian, 2007). Los genes que codifican la familia 2'-5' OAS están altamente conservados y producen proteínas enzimáticas inducibles por IFN que juegan un papel importante en los mecanismos de defensa del hospedero contra infecciones virales (Lucas *et al.*, 2003). Los polimorfismos en estos genes como OAS1 (rs1131454), OAS2 (rs1293762, rs15895 y rs1732778) y OAS3 (rs2285932 y rs2072136) han demostrado una asociación con la susceptibilidad a Virus del Nilo Occidental y encefalitis por garrapatas (Bonnievie-Nielsen *et al.*, 2005; Lim *et al.*, 2009; Barkhash *et al.*, 2010). Los estudios han demostrado que el gen que codifica OAS1b (isoforma) puede ser importante para la resistencia a la infección por flavivirus en ratones (Perelygin *et al.*, 2002). Estudios recientes han sugerido que los haplotipos OAS1 – OAS3 – OAS2 están asociados con resultados clínicos de infección por el virus del dengue. OAS3 (rs2285932 – rs2072136) haplotipo y haplotipo C – G podría estar asociado con un menor riesgo de fiebre hemorrágica del dengue, mientras que el haplotipo G – G del gen OAS2 (rs15895 y rs1732778) pueden estar asociados con un aumento riesgo de dengue sintomático que requiere hospitalización (Alagarasu *et al.*, 2013).

Un estudio reciente establece que variantes del grupo de genes OAS se asoció con la gravedad de la enfermedad del dengue; Es posible que los genotipos variantes pudieran contribuir a reducir la actividad de OAS con una disminución de la respuesta inflamatoria que conduce a la protección contra el desarrollo de los síntomas. Alternativamente, estas variantes también pueden contribuir a una mayor actividad antiviral que conduce a una replicación viral reducida, por lo tanto, menor riesgo de desarrollar síntomas clínicos (Simon-Lorriere *et al.*, 2015). En el presente trabajo se identificó asociación estadísticamente significativa para el SNP rs1293762 asociándolo con un alto riesgo de desarrollar la infección por CHIKV. En el presente trabajo, no se investigó la carga viral por lo que estudios con datos sobre la carga viral podrían proporcionar más pistas sobre el mecanismo de asociación de los polimorfismos con síntomas clínicos. La población de estudio incluidos los pacientes y los controles, viven en la misma ubicación geográfica. Hasta la fecha hay pocos datos disponibles sobre estos polimorfismos genéticos con respecto a la infección por CHIKV. Sin embargo, cuando se

intentó asociar alguno de los polimorfismos con los grupos separados por pacientes y controles no se logró asociar ningún síntoma con dichas variantes polimórficas esto podría deberse al tamaño de la población por esta razón en futuros estudios se establece un tamaño de población más amplio.

## 9. CONCLUSIÓN

Se determinó la huella genética asociada a infección por virus CHIKV. Se logró asociar el SNP 1131454 del gen OAS 1 ( $p=0.011$ ,  $OR=1$ ,  $IC=1$ ) a la infección por CHIKV igualmente se identificó asociación estadísticamente significativa el SNP 1293762 del gen OAS 2 ( $p=0.000$ ,  $IC95\%=1.11-18.29$ ). Así mismo se determinó como factor de riesgo el SNP rs1293762 ( $OR= 4.51$ ) para contraer la infección por virus chikungunya. Esto sugiere que la variación en este componente de la respuesta del sistema inmune innato podría contribuir a la susceptibilidad por CHIKV.

Se propone que los polimorfismos en el grupo de genes que codifica para la familia OAS influyen en el riesgo de desarrollar tanto la infección como síntomas clínicos en personas infectadas por CHIKV. Más estudios de seguimiento con un mayor número de muestras además de datos sobre carga viral y perfil de anticuerpos son necesarios para evaluar el papel de estos genes en asociación con síntomas post-secuela observados en pacientes con CHIKV. Se requiere una investigación más detallada con estas instrucciones para comprender la biología detrás de la infección por CHIKV y la gravedad de esta enfermedad.



## **10. PERSPECTIVAS**

Entendiendo los mecanismos detrás de la asociación de los haplotipos OAS con la infección con CHIKV podría ser útil en el diseño de terapias basadas en estos. El conocimiento del rol de la genómica humana respecto a la presentación de sintomatología en personas infectadas con el virus Chikungunya tiene potencial para predecir la población en riesgo de mostrar síntomas severos de esta enfermedad y así reforzar los métodos de prevención.

## 11. BIBLIOGRAFÍA

Alagarasu, K., Honap, T., Damle, I. M., Mulay, A. P., Shah, P. S., & Cecilia, D. (2013). Polymorphisms in the oligoadenylate synthetase gene cluster and its association with clinical outcomes of dengue virus infection. *Infection, Genetics and Evolution*, 14, 390-395.

Ausubel FM (2005) Are innate immune signaling pathways in plants and animals conserved? *Nat Immunol* 6: 973-979.

Barkhash, A. V., Perelygin, A. A., Babenko, V. N., Myasnikova, N. G., Pilipenko, P. I., Romaschenko, A. G., ... & Brinton, M. A. (2010). Variability in the 2'-5'-oligoadenylate synthetase gene cluster is associated with human predisposition to tick-borne encephalitis virus-induced disease. *Journal of Infectious Diseases*, 202(12), 1813-1818.

Bonnevie-Nielsen, V., Field, L. L., Lu, S., Zheng, D. J., Li, M., Martensen, P. M., ... & Pociot, F. (2005). Variation in antiviral 2', 5'-oligoadenylate synthetase (2' 5' AS) enzyme activity is controlled by a single-nucleotide polymorphism at a splice-acceptor site in the OAS1 gene. *The American Journal of Human Genetics*, 76(4), 623-633.

Castillo Morales, B. I. 2014. Epidemiología de la fiebre chikungunya, una nueva amenaza para México.

Cavalli-Sforza, L. L. (1973). Analytic review: some current problems of human population genetics. *American journal of human genetics*, 25(1), 82.

Choi, U. Y., Kang, J. S., Hwang, Y. S., & Kim, Y. J. (2015). Oligoadenylate synthase-like (OASL) proteins: dual functions and associations with diseases. *Experimental & molecular medicine*, 47(3), e144.

Coffey, L. L., Mertens, E., Brehin, A. C., Fernandez-Garcia, M. D., Amara, A., Després, P., & Sakuntabhai, A. (2009). Human genetic determinants of dengue virus susceptibility. *Microbes and infection*, 11(2), 143-156.

Consortium, G. P., Auton, A., Brooks, L. D., Durbin, R. M., Garrison, E. P., & Kang, H. M. (2015). A global reference for human genetic variation. *Nature*, 526(7571), 68-74.

Danis-Lozano, R., Díaz-González, E. E., Trujillo-Murillo, K. D. C., Caballero-Sosa, S., Sepúlveda-Delgado, J., Malo-García, I. R., ... & Fernández-Salas, I. (2017). Clinical

characterization of acute and convalescent illness of confirmed chikungunya cases from Chiapas, S. Mexico: A cross sectional study. *PLoS One*, 12(10), e0186923.

Dutta, S. K., & Tripathi, A. (2017). Association of toll-like receptor polymorphisms with susceptibility to chikungunya virus infection. *Virology*, 511, 207-213.

Elaiw, A. M., Alade, T. O., & Alsulami, S. M. (2018). Analysis of latent CHIKV dynamics models with general incidence rate and time delays. *Journal of Biological Dynamics*, 12(1), 700-730.

Feitosa, R. N. M., Vallinoto, A. C. R., Vasconcelos, P. F. D. C., Azevedo, R. D. S. D. S., Azevedo, V. N., Machado, L. F. A., ... & Ishak, R. (2016).

Firth, A. E., Chung, B. Y., Fleeton, M. N., & Atkins, J. F. (2008). Discovery of frameshifting in Alphavirus 6K resolves a 20-year enigma. *Virology journal*, 5(1), 1-19.

Fischer, D., Thomas, S. M., Suk, J. E., Sudre, B., Hess, A., Tjaden, N. B., ... & Semenza, J. C. (2013). Climate change effects on Chikungunya transmission in Europe: geospatial analysis of vector's climatic suitability and virus' temperature requirements. *International journal of health geographics*, 12(1), 51.

Garay-Moran, C., Román-Pedroza, J. F., Lopez-Martinez, I., Rodríguez-Martínez, J. C., Ruiz-Matus, C., Kuri-Morales, P., & Díaz-Quiñonez, J. A. (2017). Clinical and epidemiological characterization of chikungunya fever in Mexico. *Revista Panamericana de Salud Pública= Pan American Journal of Public Health*, 41, e58-e58.

García, G., Sierra, B., Pérez, A. B., Aguirre, E., Rosado, I., González, N., ... & Marchese, B. (2010). Asymptomatic dengue infection in a Cuban population confirms the protective role of the RR variant of the FcγRIIIa polymorphism. *The American journal of tropical medicine and hygiene*, 82(6), 1153-1156.

Hovanessian, A. G., & Justesen, J. (2007). The human 2'-5' oligoadenylate synthetase family: unique interferon-inducible enzymes catalyzing 2'-5' instead of 3'-5' phosphodiester bond formation. *Biochimie*, 89(6-7), 779-788.

Jain, J., Kumari, A., Somvanshi, P., Grover, A., Pai, S., & Sunil, S. (2017). In silico analysis of natural compounds targeting structural and nonstructural proteins of chikungunya virus. *F1000Research*, 6.

Kam, Y. W., Ong, E. K., Rénia, L., Tong, J. C., & Ng, L. F. (2009). Immuno-biology of Chikungunya and implications for disease intervention. *Microbes and infection*, *11*(14-15), 1186-1196.

Khan, A. H., Morita, K., del Carmen Parquet, M., Hasebe, F., Mathenge, E. G., & Igarashi, A. (2002). Complete nucleotide sequence of chikungunya virus and evidence for an internal polyadenylation site. *Journal of General Virology*, *83*(12), 3075-3084.

Lahariya, C., & Pradhan, S. K. (2006). Emergence of chikungunya virus in Indian subcontinent after 32 years: a review. *Journal of vector borne diseases*, *43*(4), 151.

Lan, N. T. P., & Hirayama, K. (2011). Host genetic susceptibility to severe dengue infection. *Tropical medicine and health*, *39*(4SUPPLEMENT), S73-S81.

Levy, D. E., & García-Sastre, A. (2001). The virus battles: IFN induction of the antiviral state and mechanisms of viral evasion. *Cytokine & growth factor reviews*, *12*(2-3), 143-156.

Lim, J. K., Lisco, A., McDermott, D. H., Huynh, L., Ward, J. M., Johnson, B., Johnson, H., Pape, J., Foster, G. A., Krystof, D., Follmann, D., Stramer, S. L., Margolis, L. B., Murphy, P. M. (2009). Genetic variation in OAS1 is a risk factor for initial infection with West Nile virus in man. *PLoS pathogens*, *5*(2), e1000321.

Lucas, M., Mashimo, T., Frenkiel, M. P., Simon-Chazottes, D., Montagutelli, X., Ceccaldi, P. E., ... & Desprès, P. (2003). Infection of mouse neurones by West Nile virus is modulated by the interferon-inducible 2'-5' oligoadenylate synthetase 1b protein. *Immunology and cell biology*, *81*(3), 230-236.

Mardekian, S. K., & Roberts, A. L. (2015). Diagnostic options and challenges for dengue and chikungunya viruses. *BioMed research international*, 2015.

Nava-Frías, M., Searcy-Pavía, R. E., Juárez-Contreras, C. A., & Valencia-Bautista, A. (2016). Enfermedad por virus de chikungunya: Actualidad en México. *Boletín médico del Hospital Infantil de México*, *73*(2), 67-74.

Perelygin, A. A., Zharkikh, A. A., Scherbik, S. V., & Brinton, M. A. (2006). The mammalian 2'-5' oligoadenylate synthetase gene family: evidence for concerted evolution of paralogous Oas1 genes in Rodentia and Artiodactyla. *Journal of molecular evolution*, *63*(4), 562-576.

Porta, L. (2012). Fiebre Chikungunya Amenaza para la Región de las Américas. *Salud*, 1051, 31.

Powers, A. M. & Logue, C. H. Changing patterns of chikungunya virus: re-emergence of a zoonotic arbovirus. *J. Gen. Virol.* 88, 2363–2377 (2007)

Rivera-Ávila, R. C. (2014). Fiebre chikungunya en México: caso confirmado y apuntes para la respuesta epidemiológica. *salud pública de méxico*, 56, 402-404.

Sakuntabhai, A., Turbpaiboon, C., Casadémont, I., Chuansumrit, A., Lowhnoo, T., Kajaste-Rudnitski, A., ... & Chaiyaratana, W. (2005). A variant in the CD209 promoter is associated with severity of dengue disease. *Nature genetics*, 37(5), 507.

Schuffenecker, I., Itean, I., Michault, A., Murri, S., Frangeul, L., Vaney, M. C., ... & Brisse, S. (2006). Genome microevolution of chikungunya viruses causing the Indian Ocean outbreak. *PLoS medicine*, 3(7), e263.

Schwartz, O., & Albert, M. L. (2010). Biology and pathogenesis of chikungunya virus. *Nature Reviews Microbiology*, 8(7), 491.

Silva, L. K., Blanton, R. E., Parrado, A. R., Melo, P. S., Morato, V. G., Reis, E. A., ... & Barreto, M. L. (2010). Dengue hemorrhagic fever is associated with polymorphisms in JAK1. *European Journal of Human Genetics*, 18(11), 1221-1227.

Silverman, R. H. (2007). Viral encounters with 2', 5'-oligoadenylate synthetase and RNase L during the interferon antiviral response. *Journal of virology*, 81(23), 12720-12729.

Simon-Loriere, E., Lin, R. J., Kalayanarooj, S. M., Chuansumrit, A., Casademont, I., Lin, S. Y., ... & Sakuntabhai, A. (2015). High anti-dengue virus activity of the OAS gene family is associated with increased severity of dengue. *The Journal of infectious diseases*, 212(12), 2011-2020.

Solignat, M., Gay, B., Higgs, S., Briant, L., & Devaux, C. (2009). Replication cycle of chikungunya: a re-emerging arbovirus. *Virology*, 393(2), 183-197.

Strauss, E. G., Rice, C. M., & Strauss, J. H. (1984). Complete nucleotide sequence of the genomic RNA of Sindbis virus. *Virology*, 133(1), 92-110.

Thamizhmani, R., & Vijayachari, P. (2014). Association of dengue virus infection susceptibility with polymorphisms of 2'-5'-oligoadenylate synthetase genes: a case-control study. *Brazilian Journal of Infectious Diseases*, 18(5), 548-550.

Thanapati, S., Hande, A., Das, R., Gurav, Y., & Tripathy, A. S. (2014). Association of human leukocyte antigen class II allele and haplotypes in chikungunya viral infection in a western Indian population. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*, 108(5), 277-282.

Van Manen, D., Delaneau, O., Kootstra, N. A., Boeser-Nunnink, B. D., Limou, S., Bol, S. M., ... & Schuitemaker, H. (2011). Genome-wide association scan in HIV-1-infected individuals identifying variants influencing disease course. *PLoS One*, 6(7), e22208.

Weaver, S. C., & Lecuit, M. 2015. Chikungunya virus and the global spread of a mosquito-borne disease. *New England Journal of Medicine*, 372(13), 1231-1239.

Zhao, L., Jha, B. K., Wu, A., Elliott, R., Ziebuhr, J., Gorbalenya, A. E., Silverman, E. H., & Weiss, S. R. (2012). Antagonism of the interferon-induced OAS-RNase L pathway by murine coronavirus ns2 protein is required for virus replication and liver pathology. *Cell host & microbe*, 11(6), 607-616.

## 12.

## ANEXOS

Anexo 1.

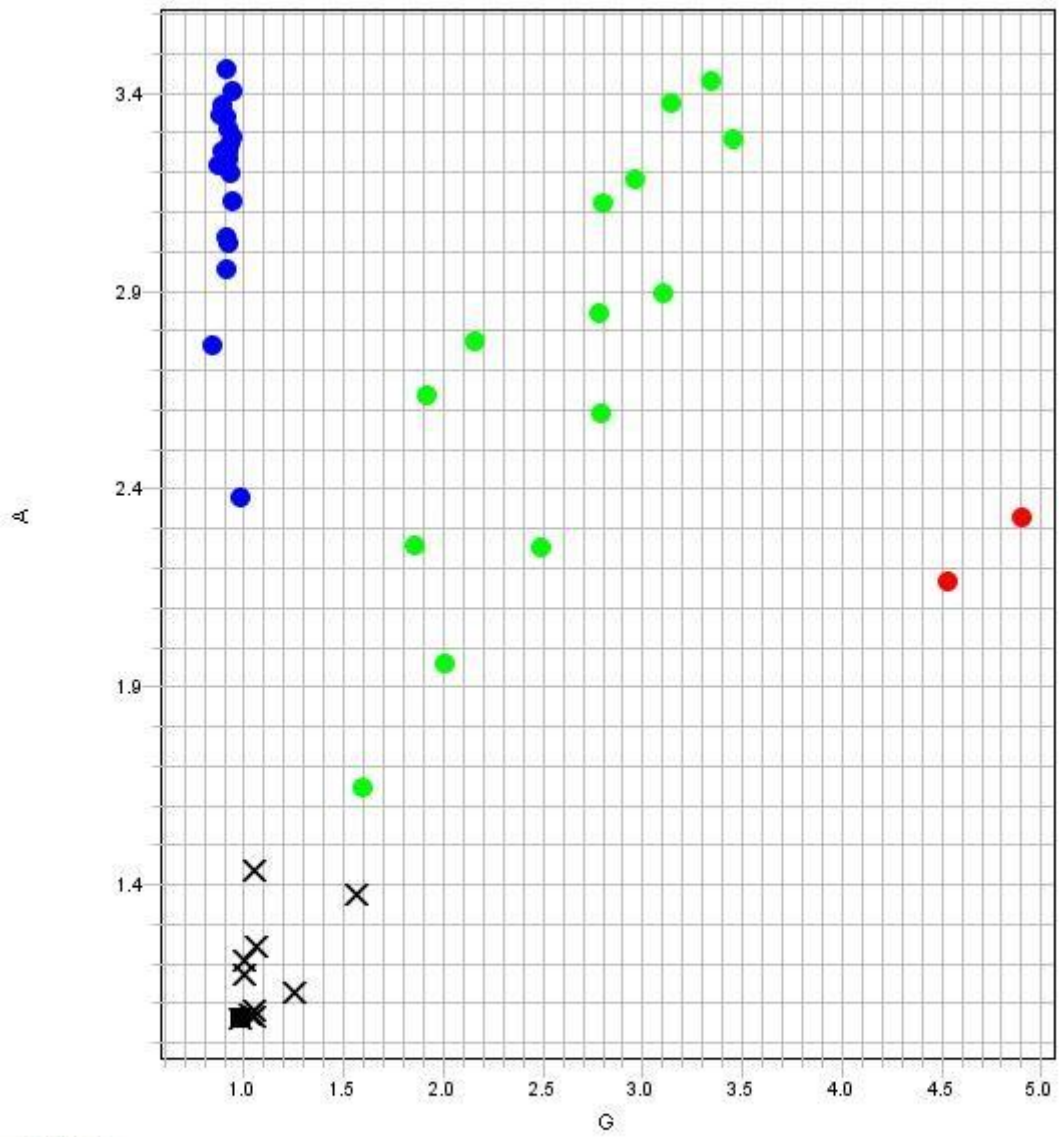
Encuesta epidemiológica

<b>Datos del paciente</b>				
Nombre		Edad		Sexo
Localidad		Tiempo de residencia		Etnia
<b>Datos epidemiológicos</b>				
Ha salido de su lugar de residencia las últimas 3 semanas				
En caso de respuesta afirmativa, especifique donde.				
Contacto con animales	Mosco	Chinche	Garrapata	Otro
Existen enfermos similares en la localidad			Familiares enfermos similares	
<b>Cuadro Clínico</b>				
Fecha de inicio de síntomas				
Fiebre		Temperatura		
Sarpullido macular o papular		Artritis o artralgia		
Conjuntivitis no purulenta		Mialgias		
Dolor retro-orbital		Edema de extremidades		
Vomito		Malestar general		

Anexo 2. Plots de discriminación alélica

**rs1131454**

### Allelic Discrimination Plot

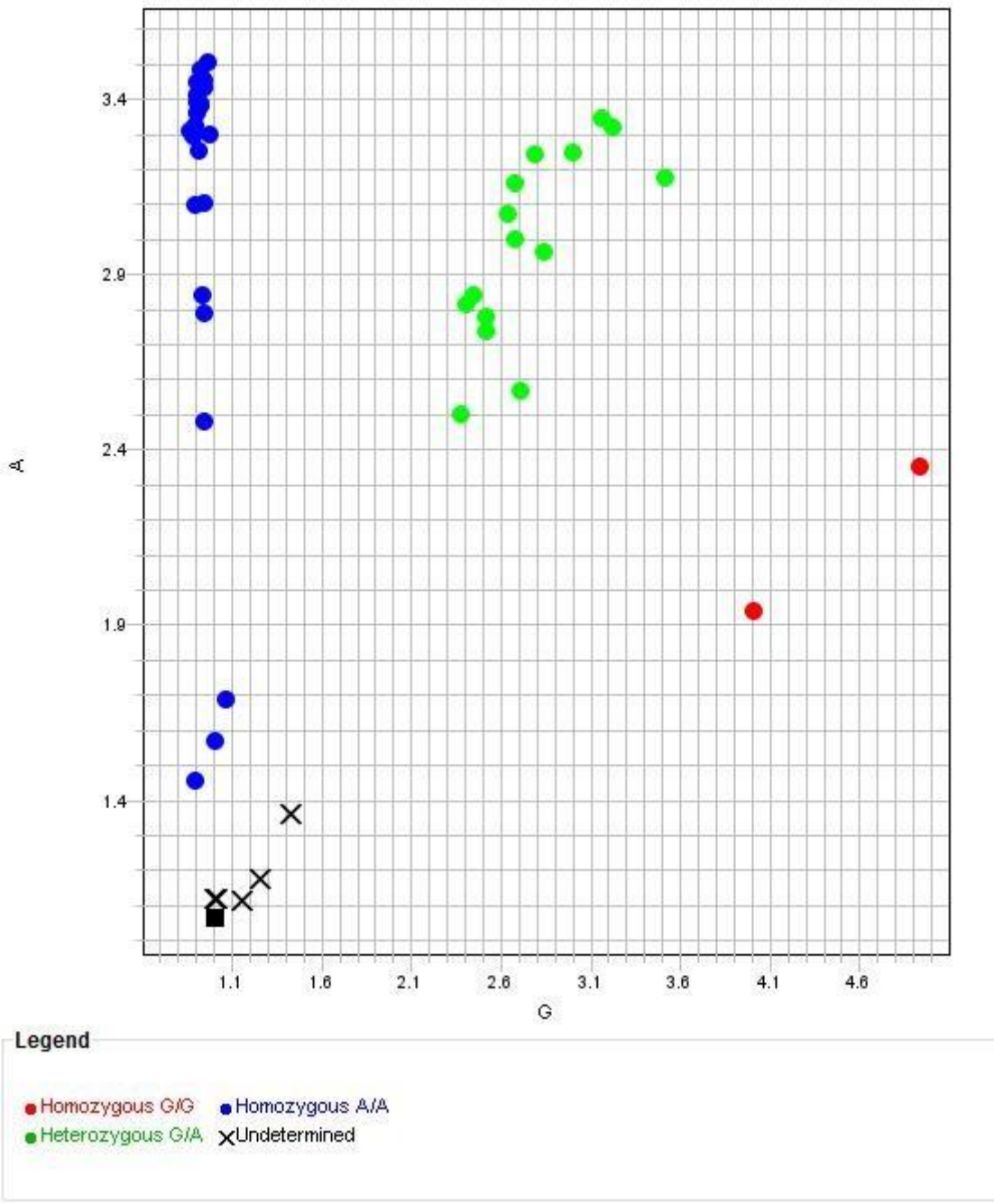


#### Legend

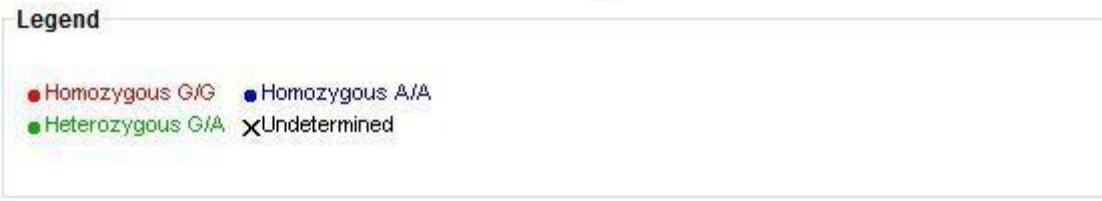
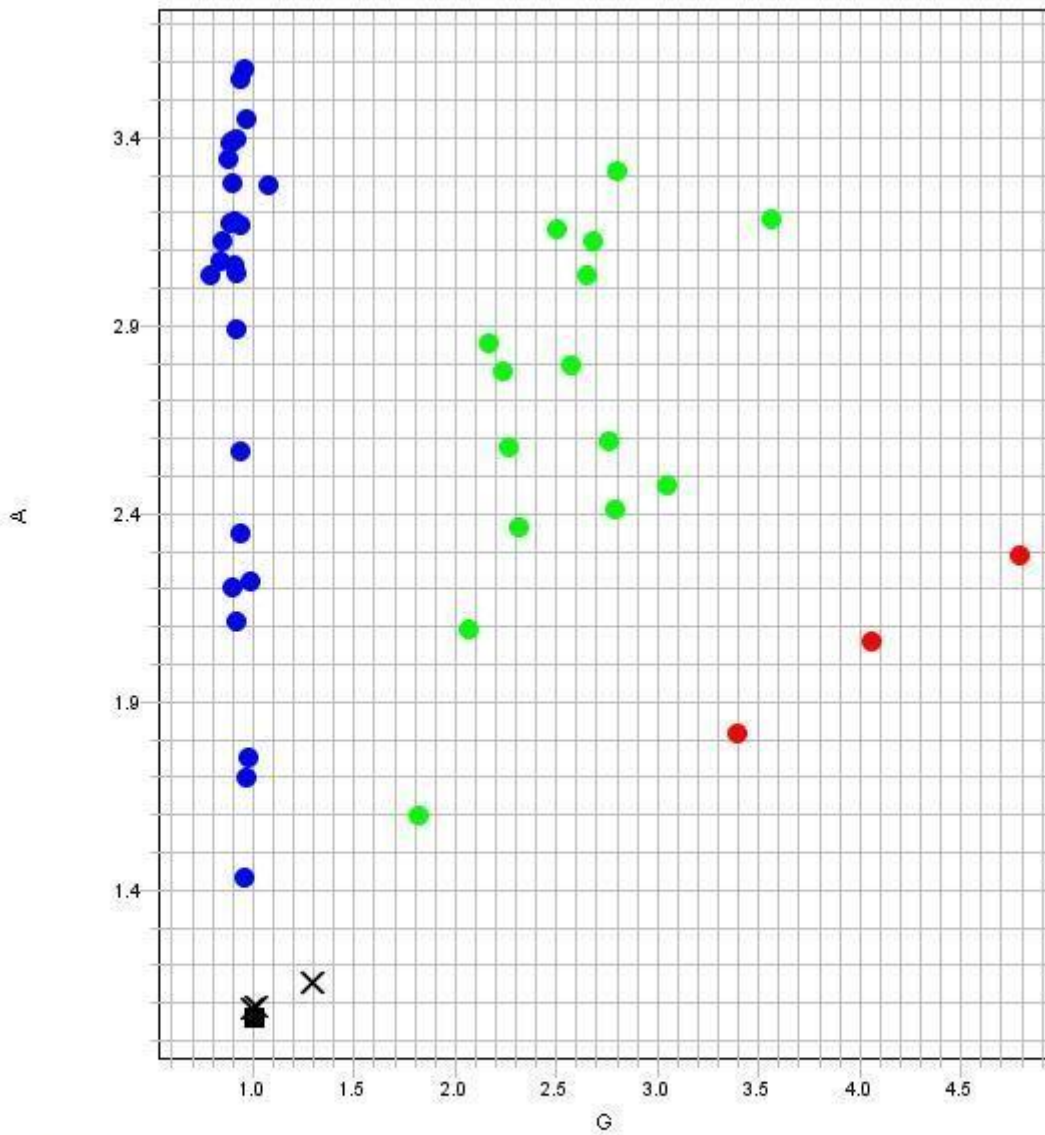
- Homozygous G/G
- Homozygous A/A
- Heterozygous G/A
- × Undetermined



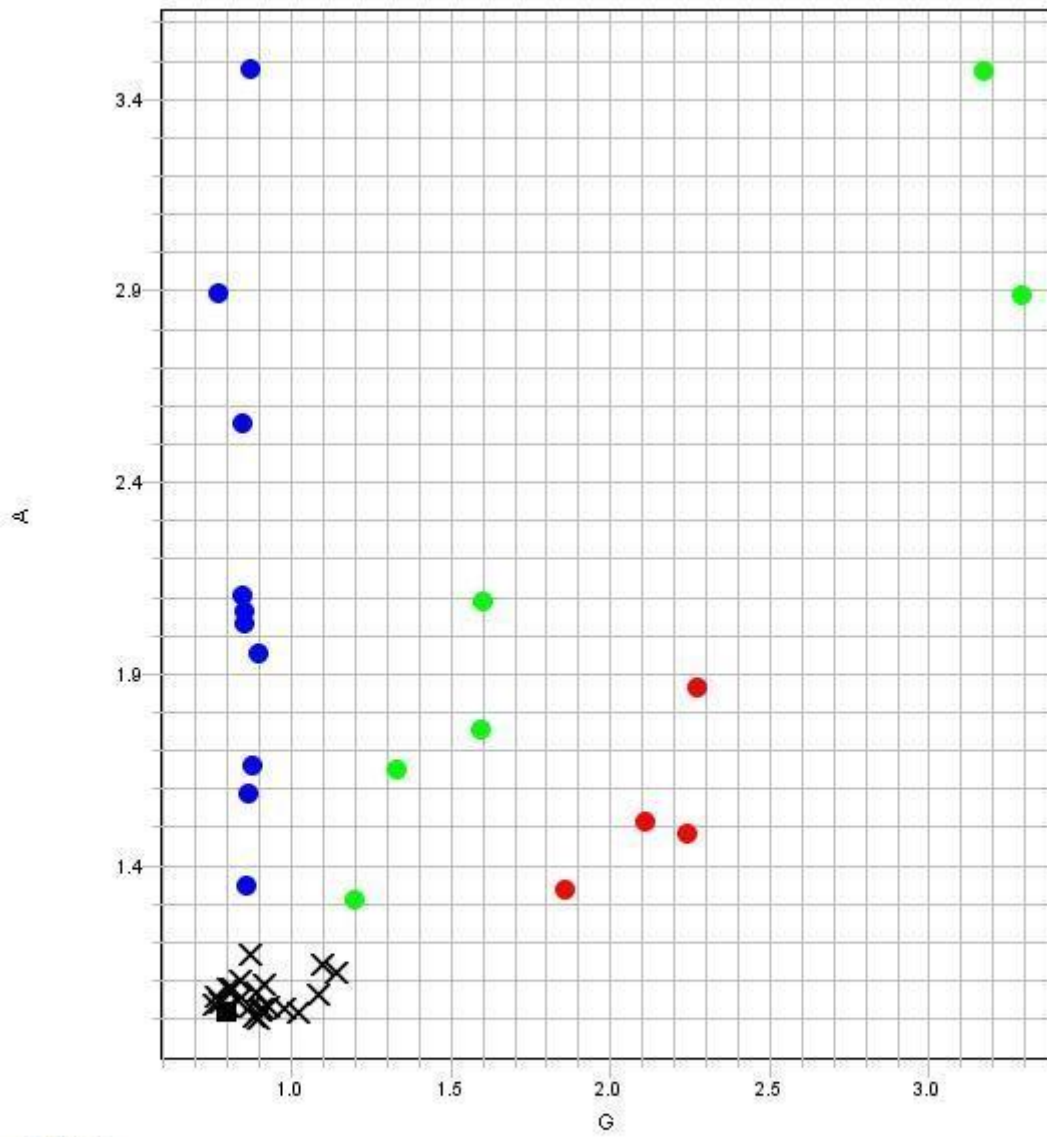
### Allelic Discrimination Plot



### Allelic Discrimination Plot



### Allelic Discrimination Plot

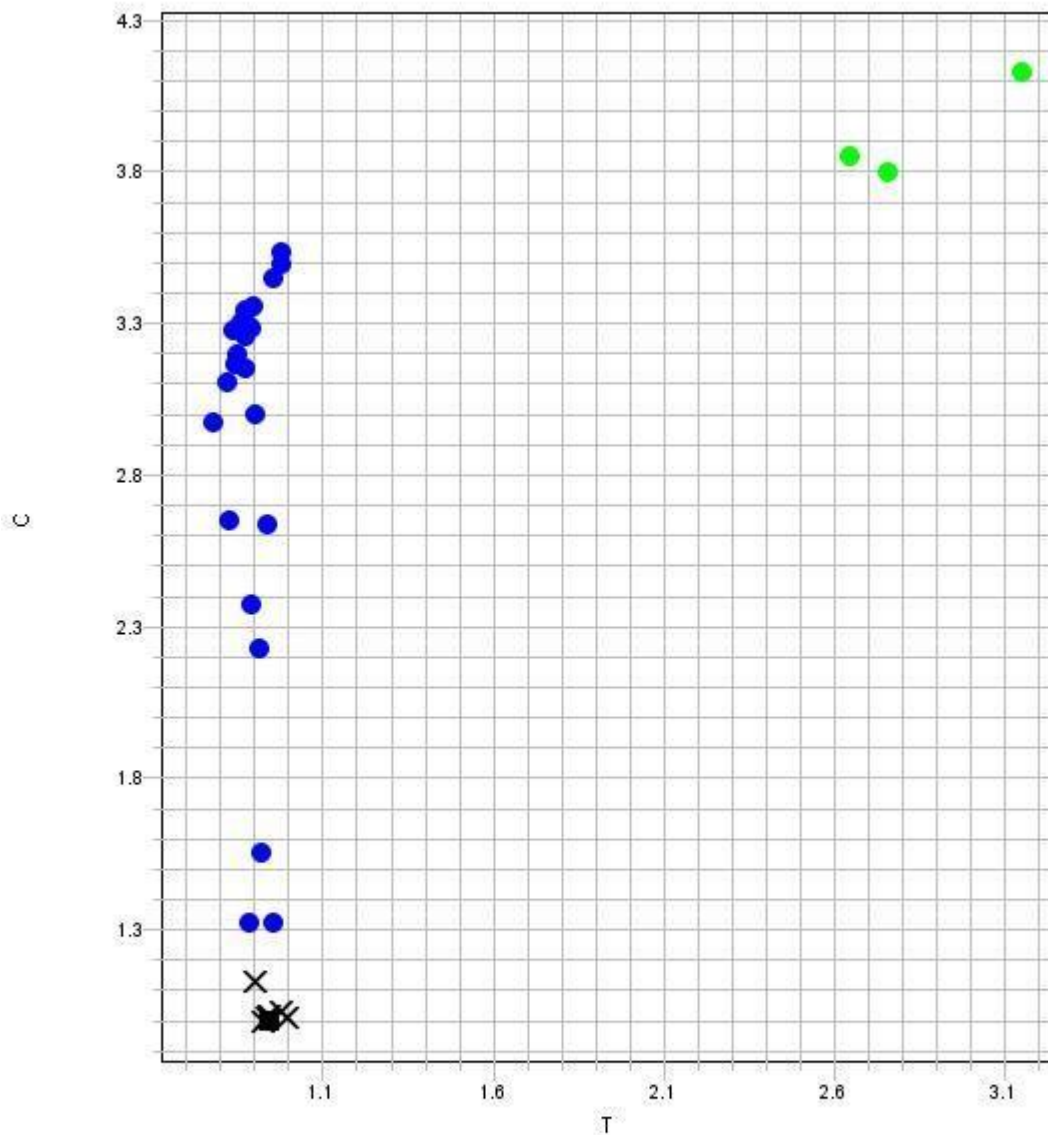


#### Legend

- Homozygous G/G
- Homozygous A/A
- Heterozygous G/A
- × Undetermined

rs15895

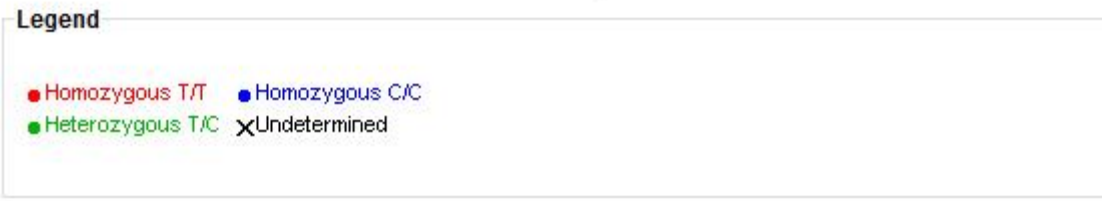
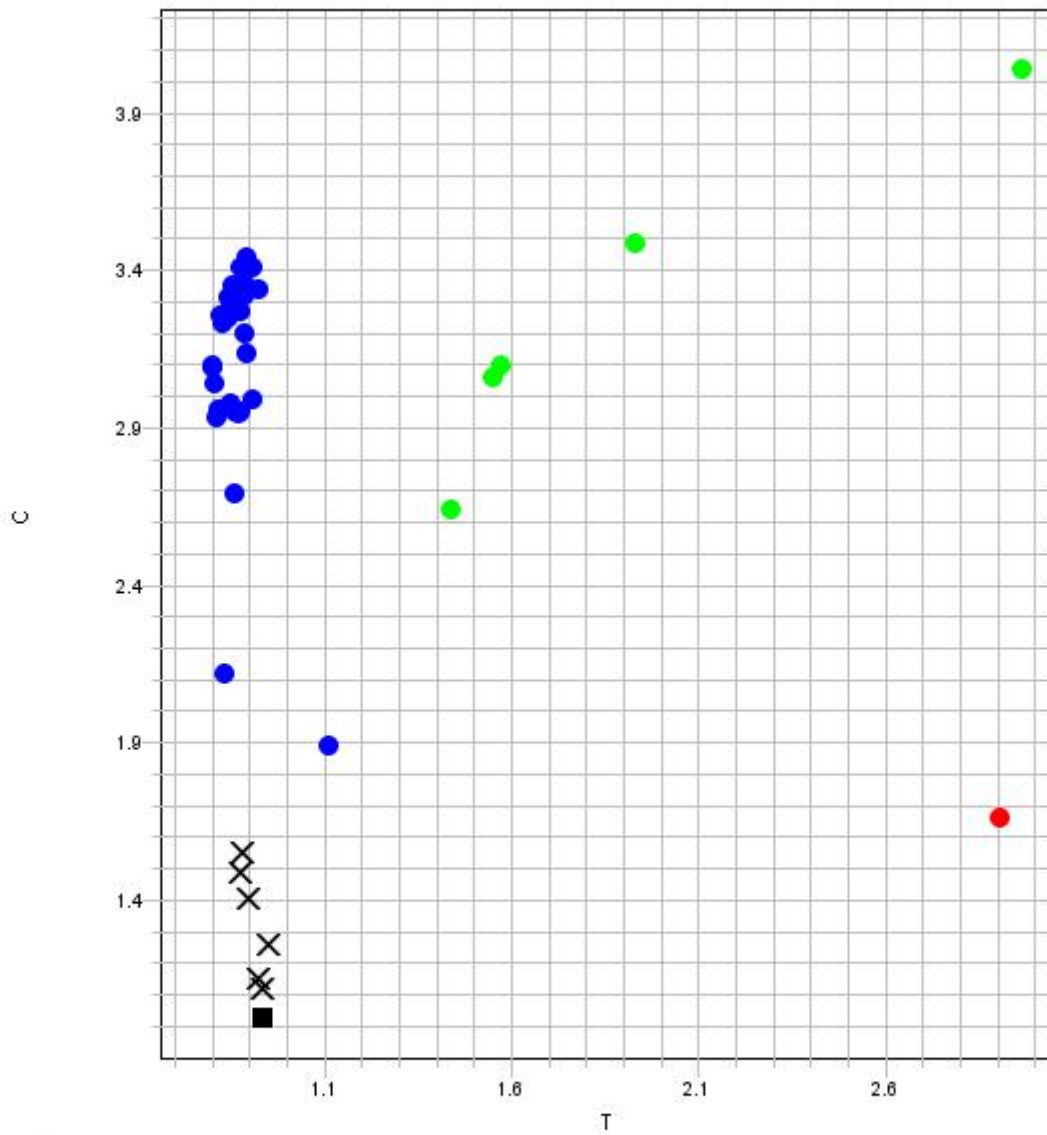
### Allelic Discrimination Plot



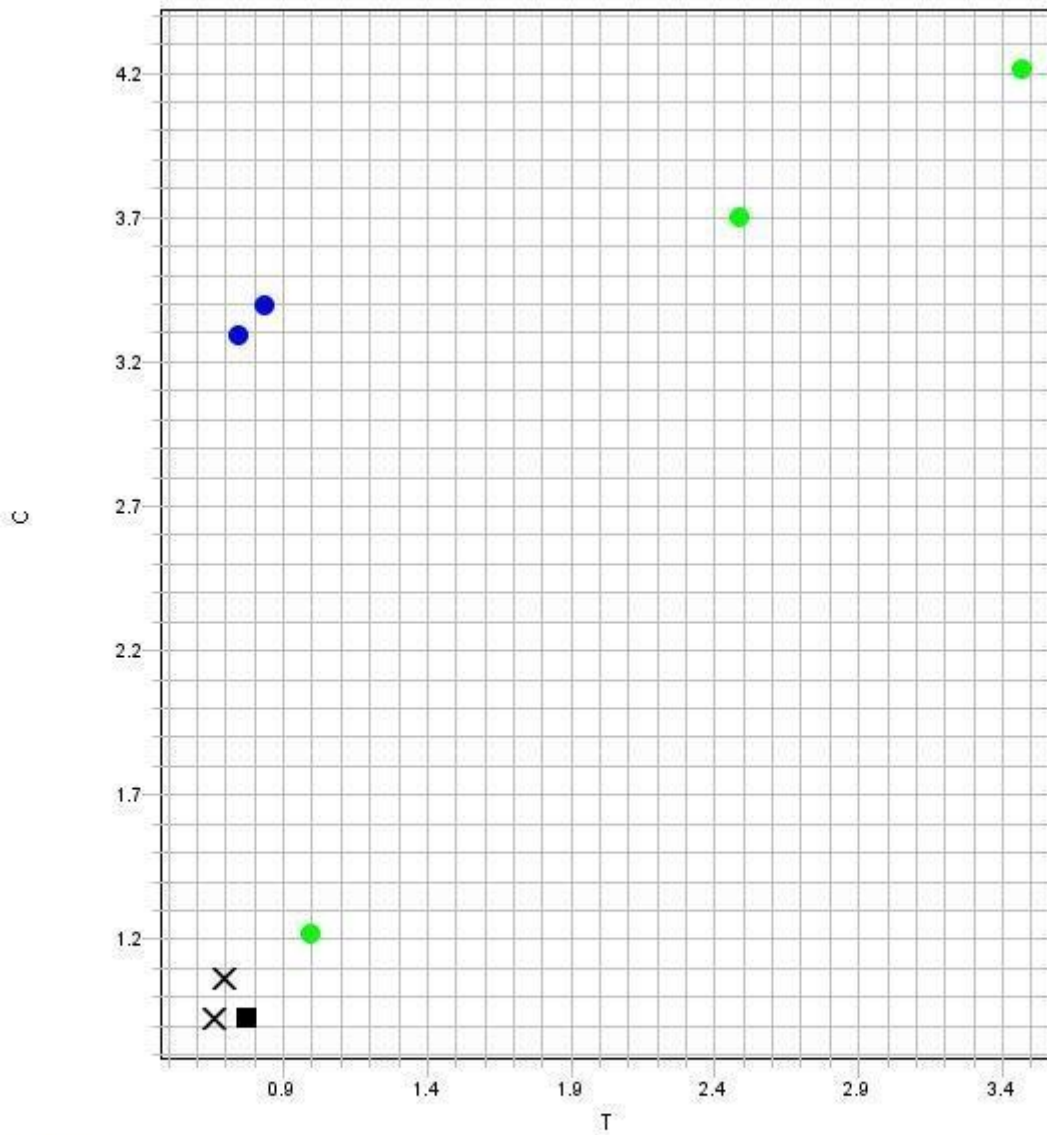
#### Legend

- Homozygous T/T
- Homozygous C/C
- Heterozygous T/C
- ✕ Undetermined

### Allelic Discrimination Plot



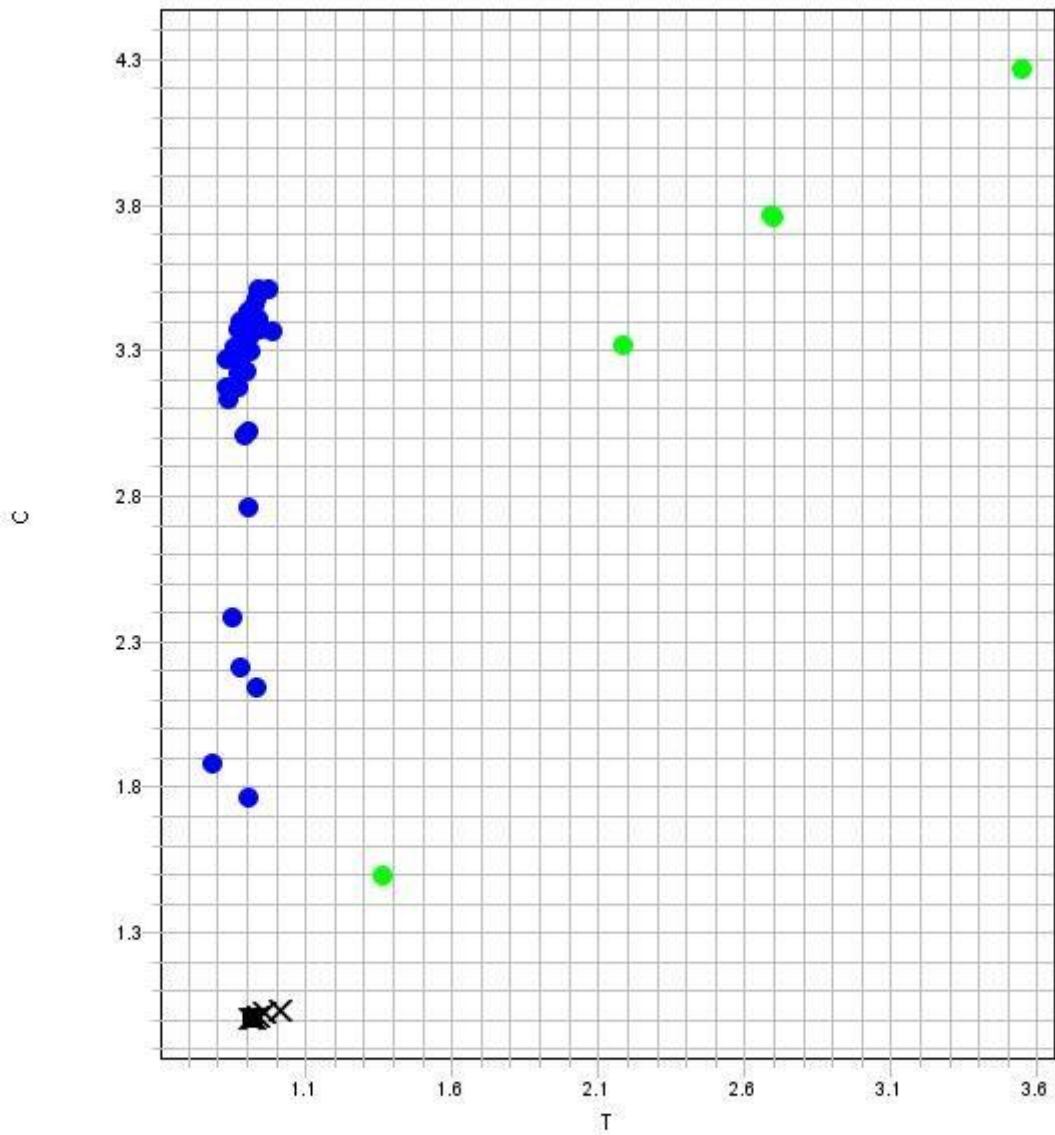
### Allelic Discrimination Plot



#### Legend

- Homozygous T/T
- Homozygous C/C
- Heterozygous T/C
- × Undetermined

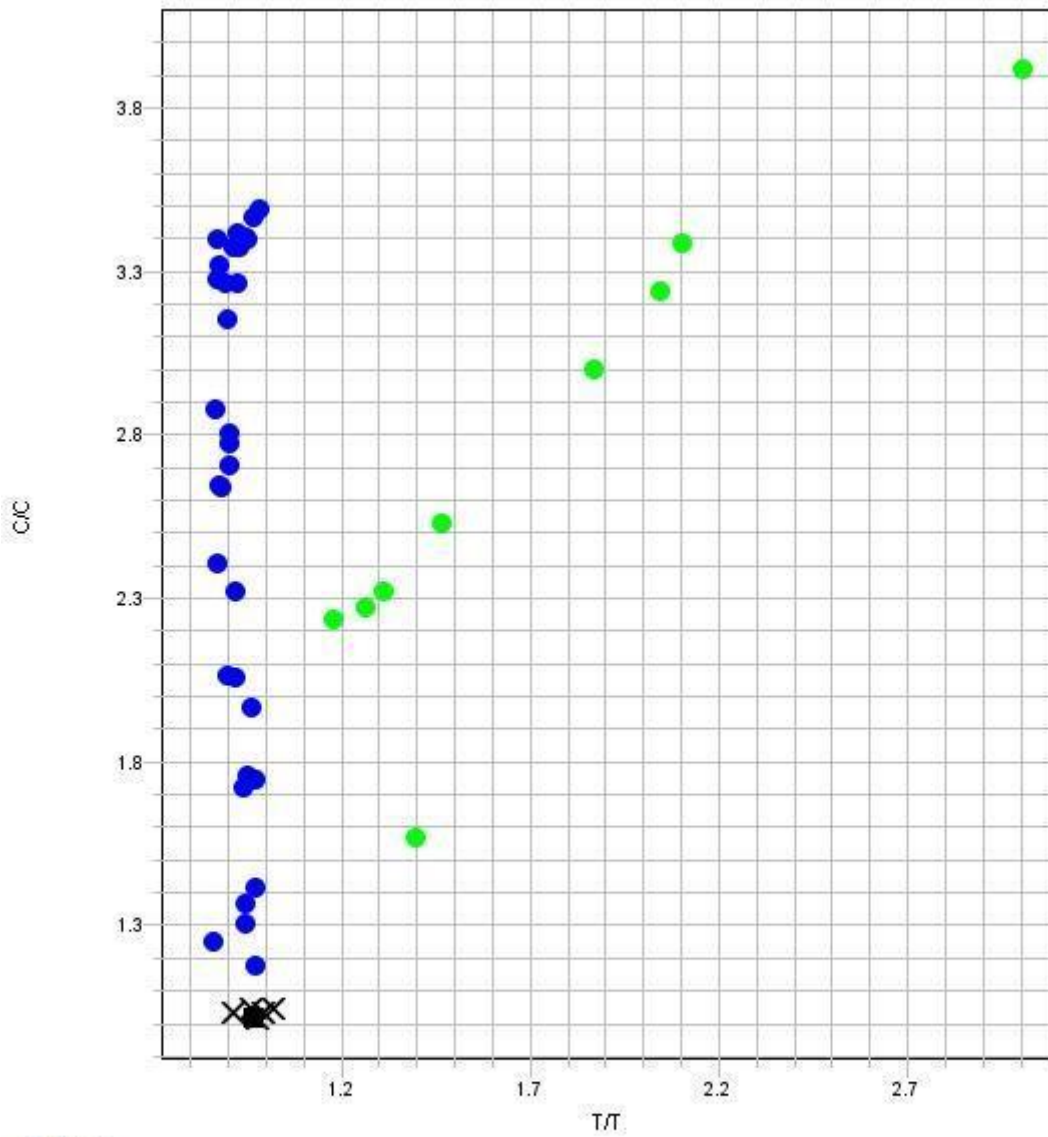
### Allelic Discrimination Plot



#### Legend

- Homozygous T/T
- Homozygous C/C
- Heterozygous T/C
- ✕ Undetermined

### Allelic Discrimination Plot



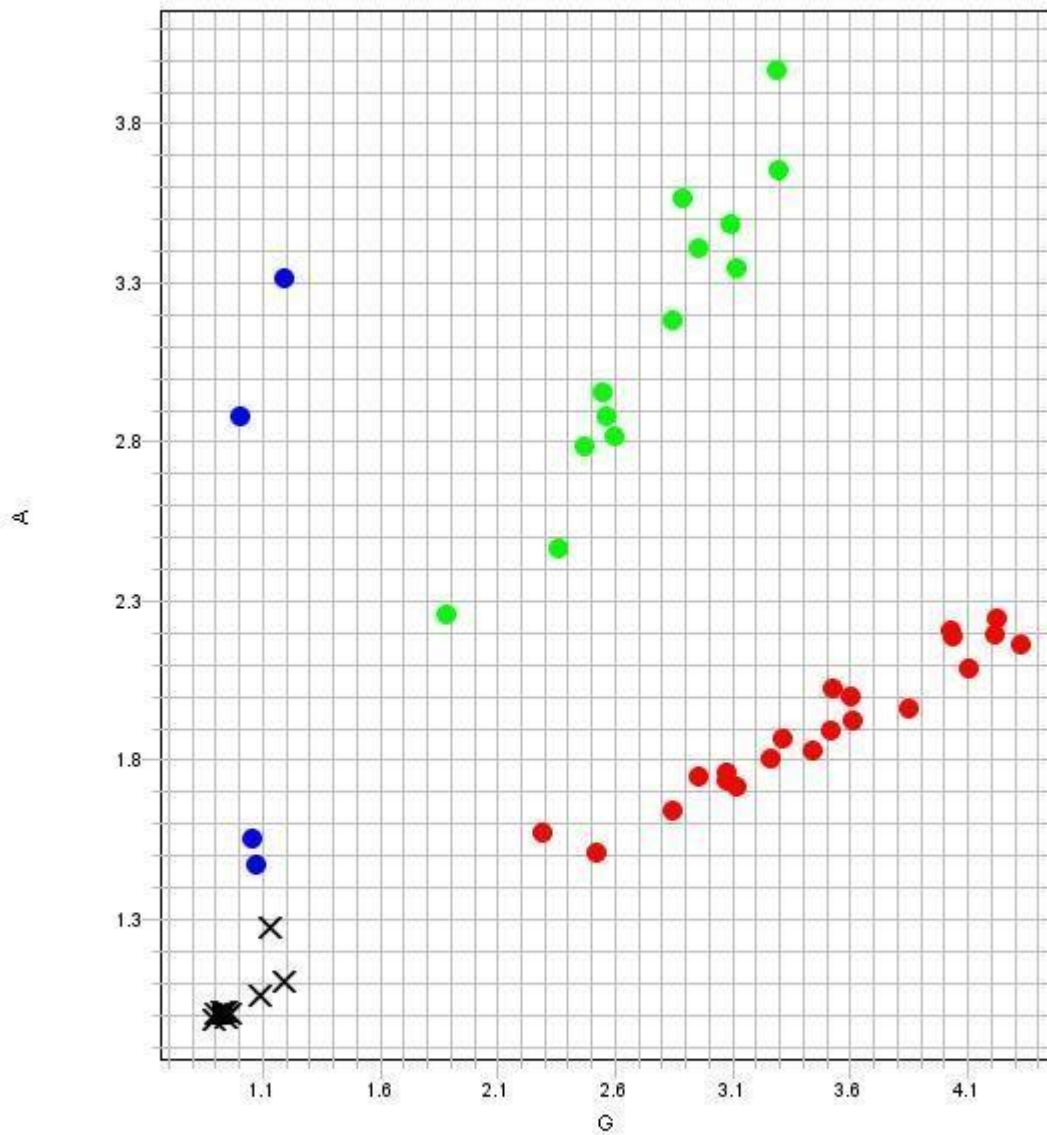
#### Legend

- Homozygous T/T/T/T
- Homozygous C/C/C/C
- Heterozygous T/T/C/C
- × Undetermined



rs1732778

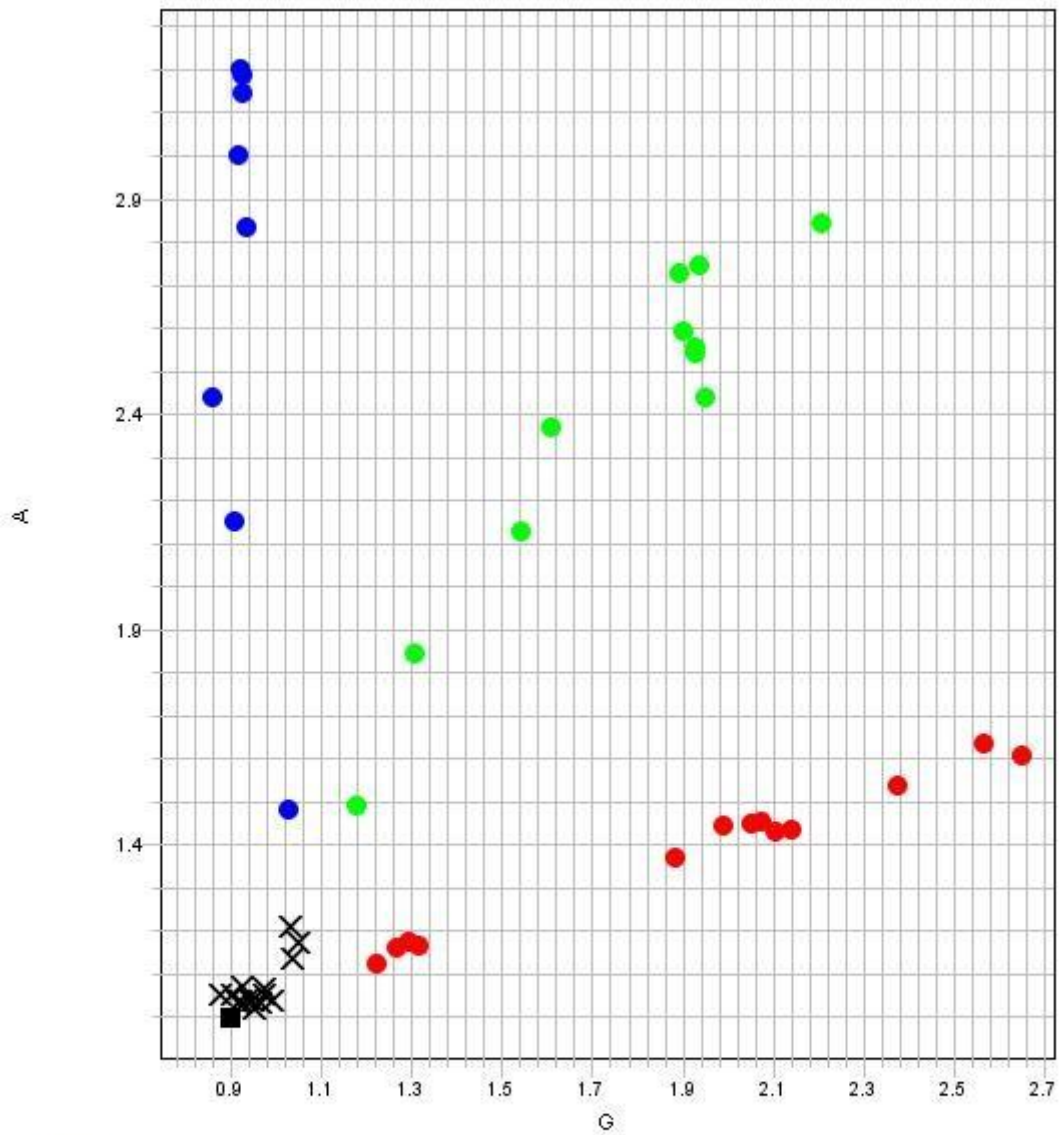
### Allelic Discrimination Plot



#### Legend

- Homozygous G/G
- Homozygous A/A
- Heterozygous G/A
- ✕ Undetermined

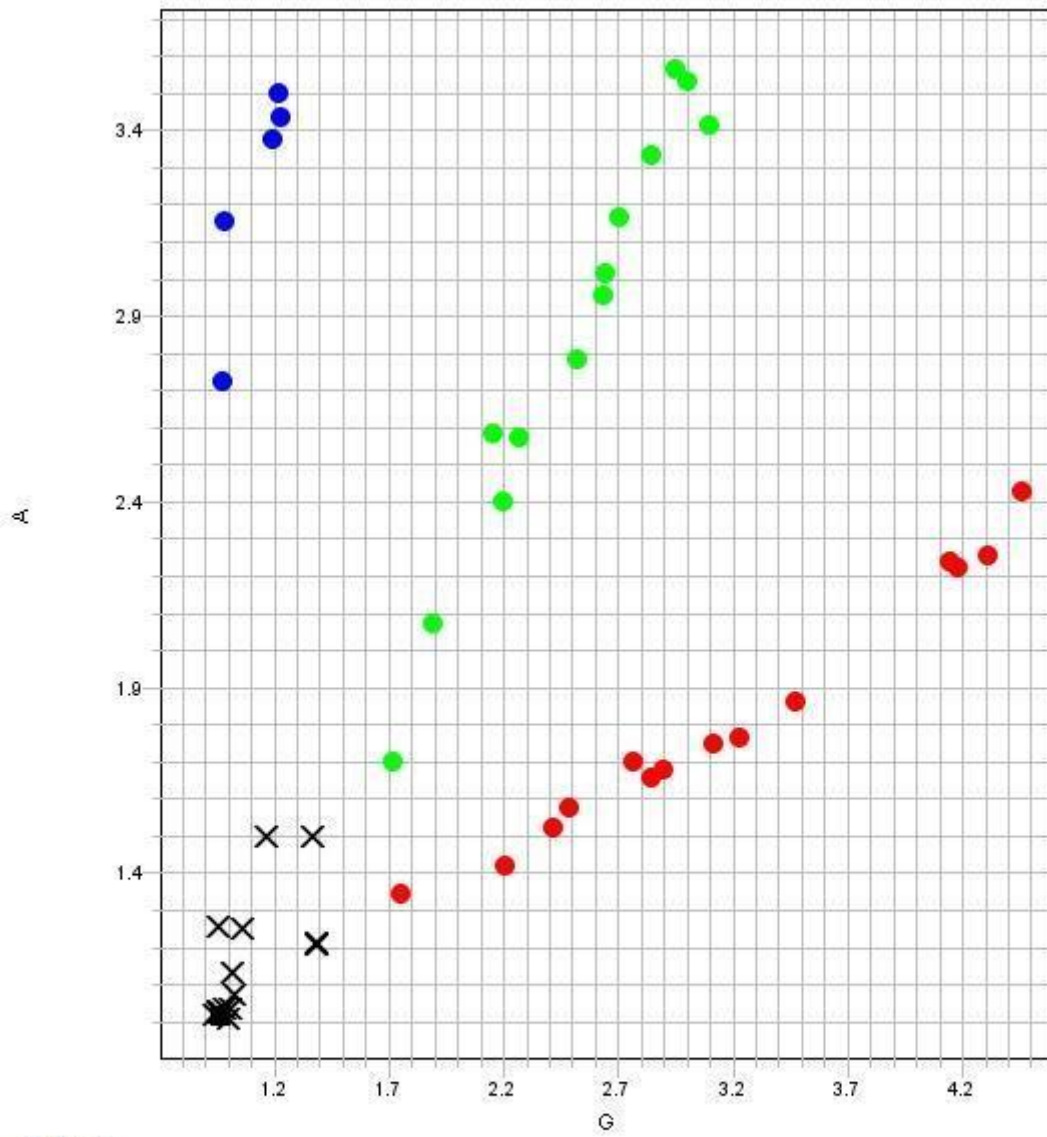
### Allelic Discrimination Plot



#### Legend

- Homozygous G/G
- Homozygous A/A
- Heterozygous G/A
- × Undetermined

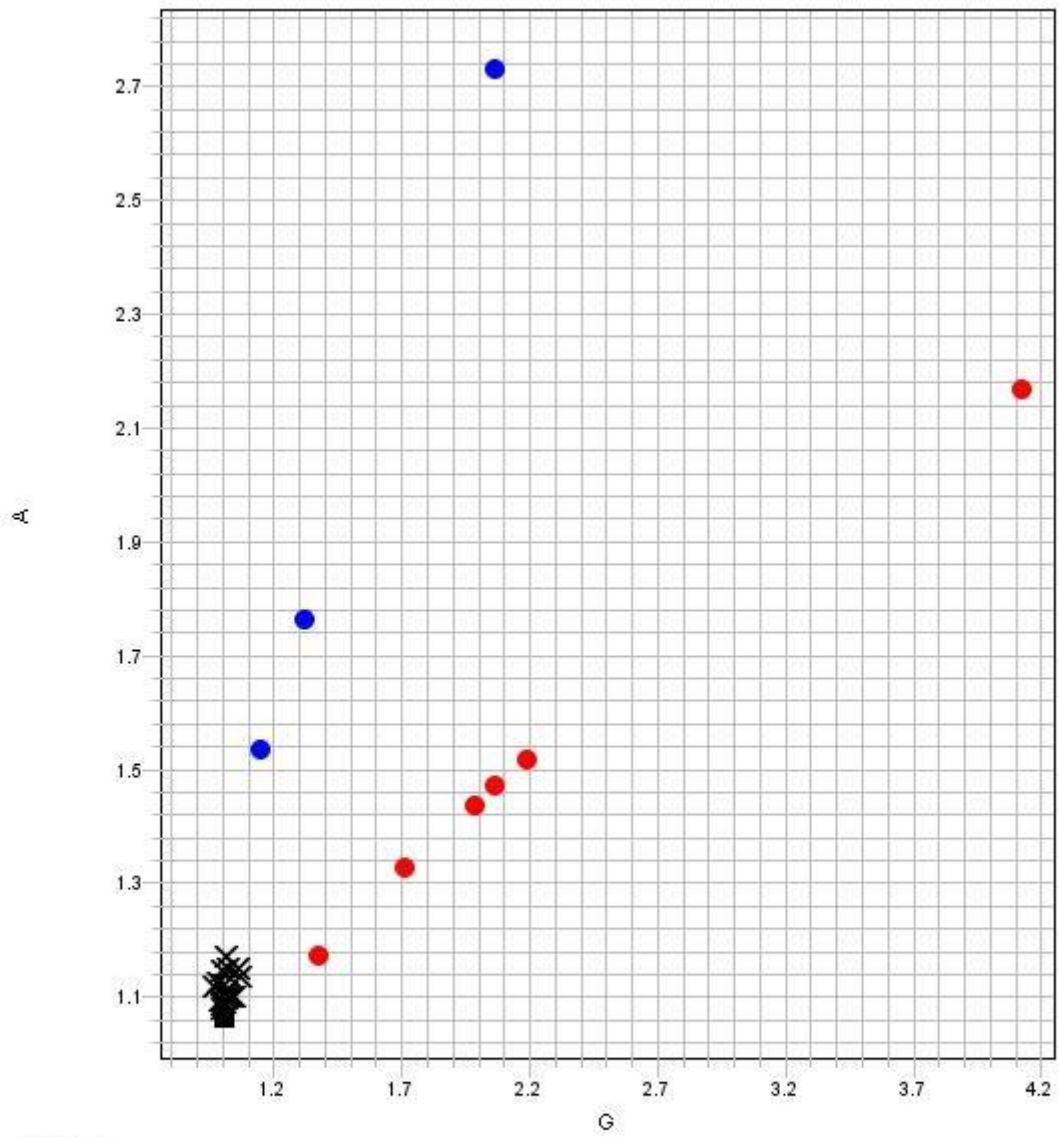
### Allelic Discrimination Plot



#### Legend

- Homozygous G/G
- Homozygous A/A
- Heterozygous G/A
- × Undetermined

### Allelic Discrimination Plot

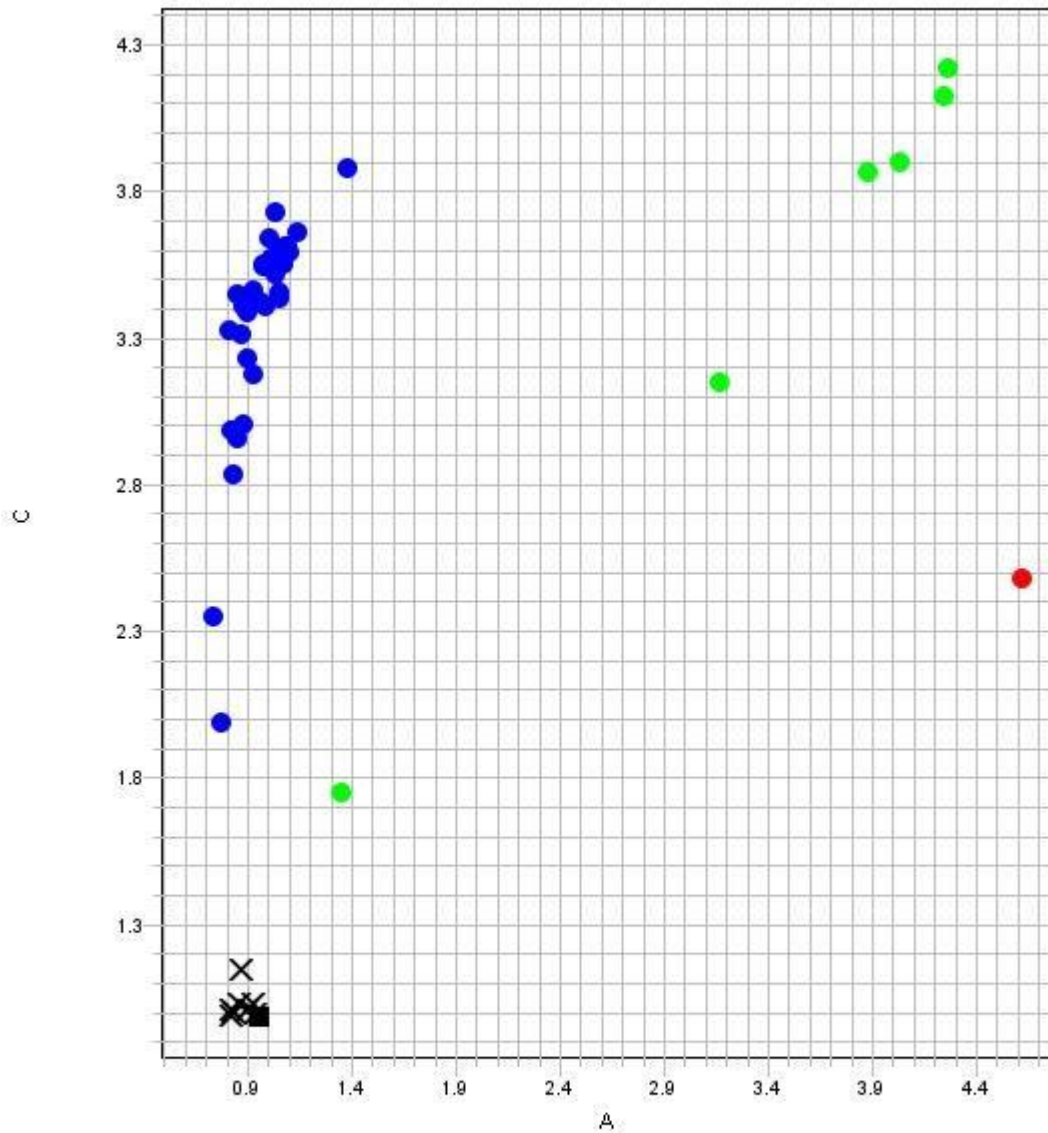


#### Legend

- Homozygous G/G
- Homozygous A/A
- Heterozygous G/A
- × Undetermined

rs1293762

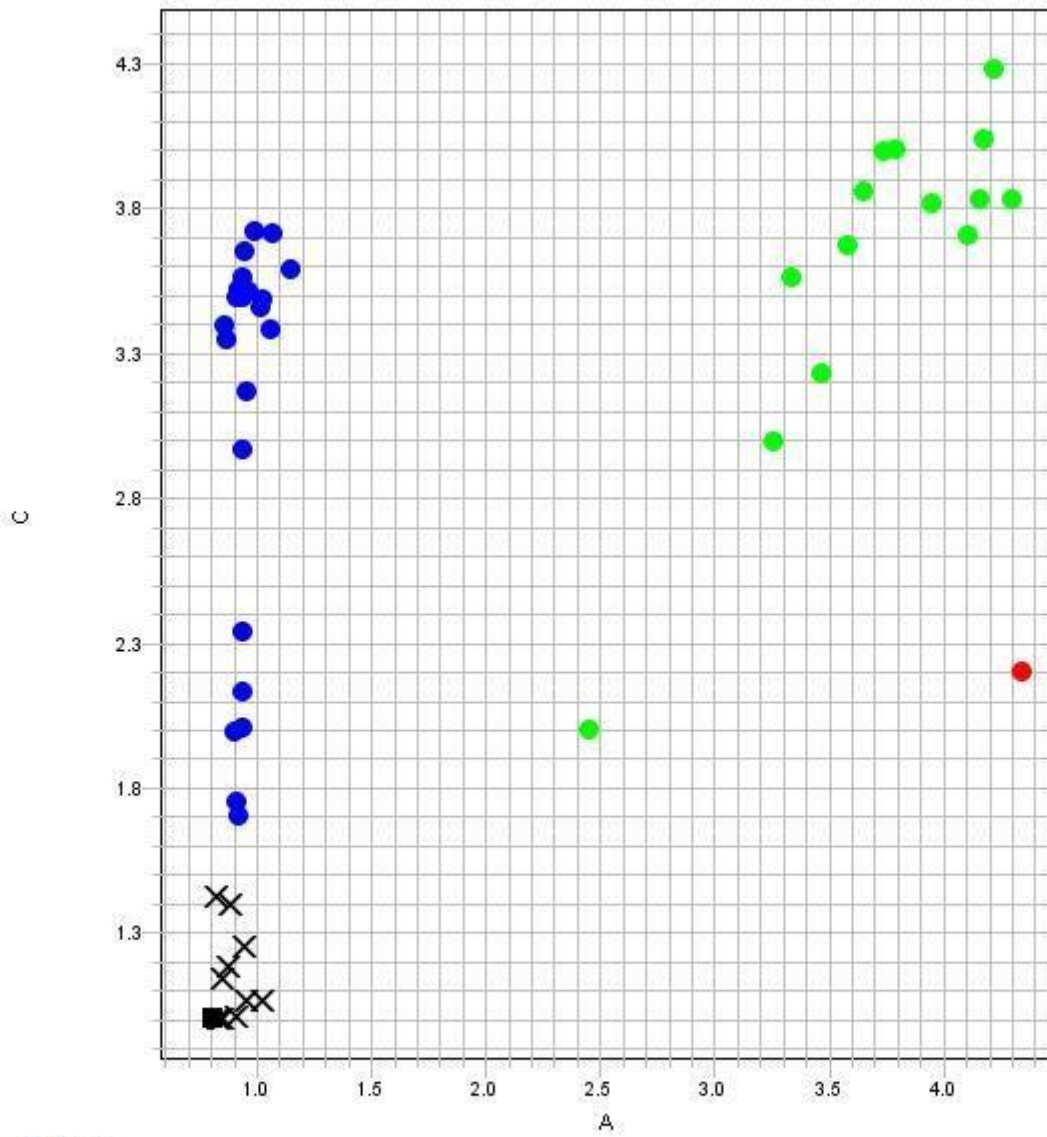
### Allelic Discrimination Plot



#### Legend

- Homozygous A/A
- Homozygous C/C
- Heterozygous A/C
- × Undetermined

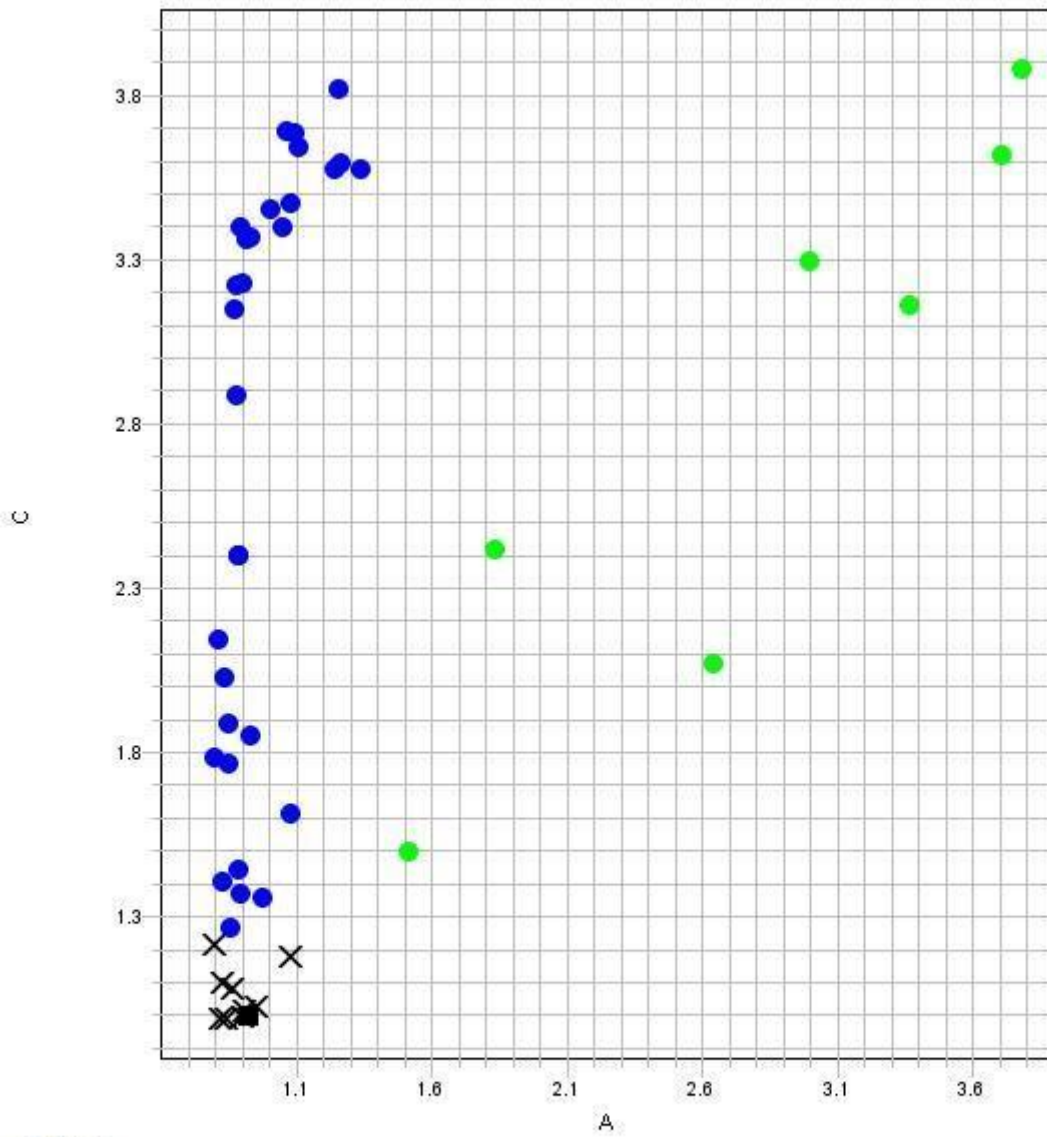
### Allelic Discrimination Plot



#### Legend

- Homozygous A/A
- Homozygous C/C
- Heterozygous A/C
- × Undetermined

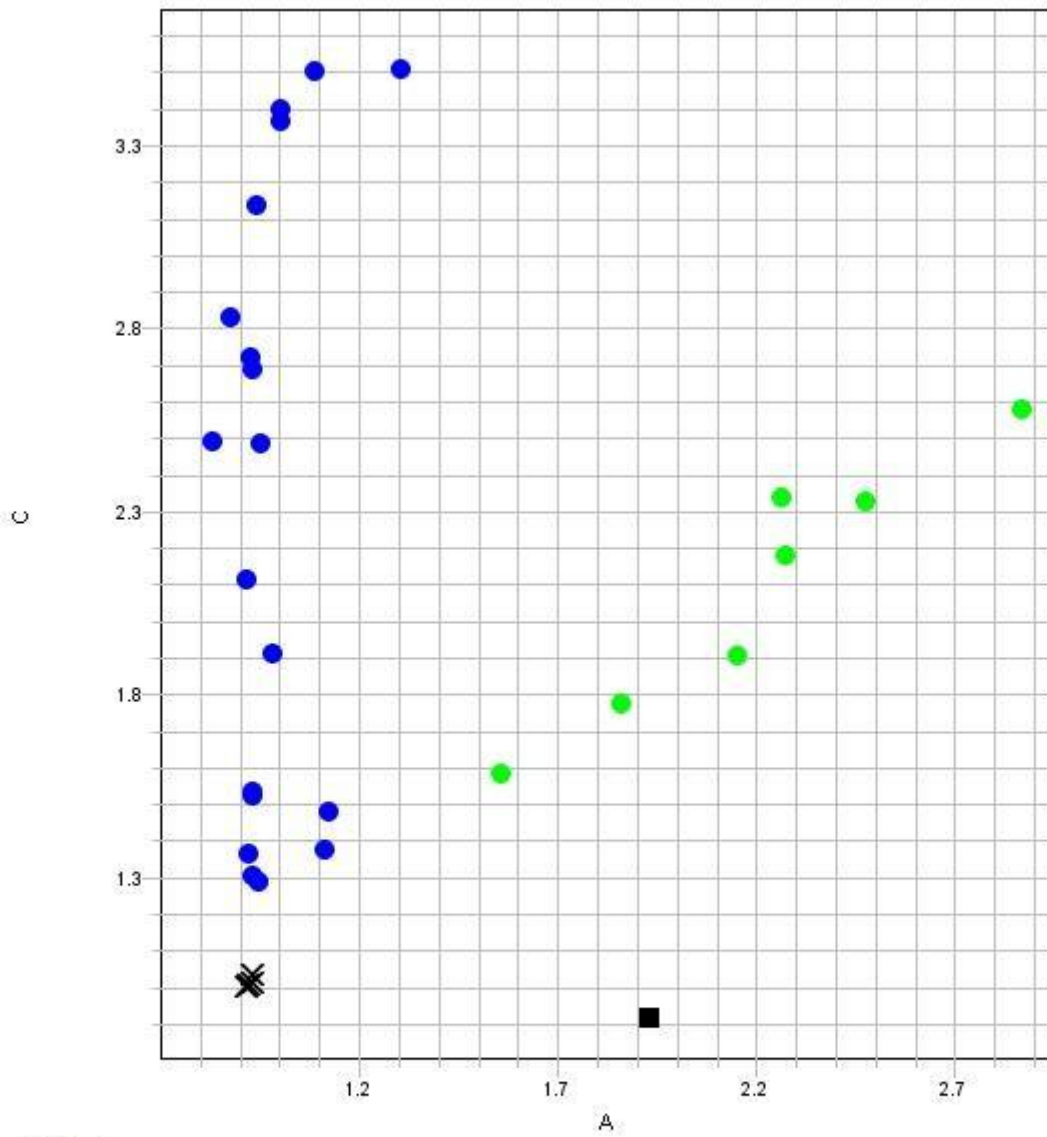
### Allelic Discrimination Plot



**Legend**

- Homozygous A/A
- Homozygous C/C
- Heterozygous A/C
- × Undetermined

### Allelic Discrimination Plot



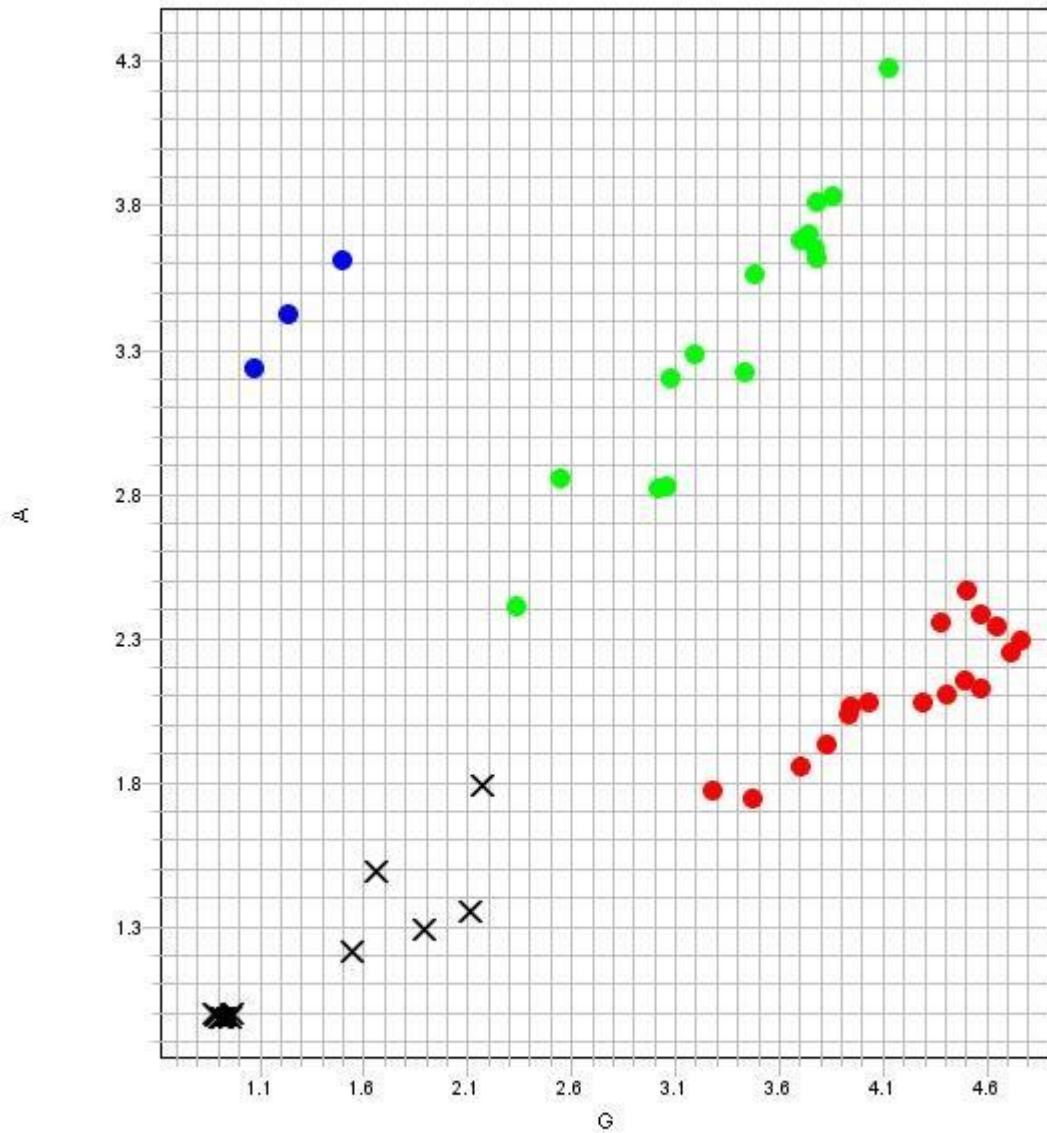
#### Legend

- Homozygous A/A
- Homozygous C/C
- Heterozygous A/C
- ✕ Undetermined



rs2072136

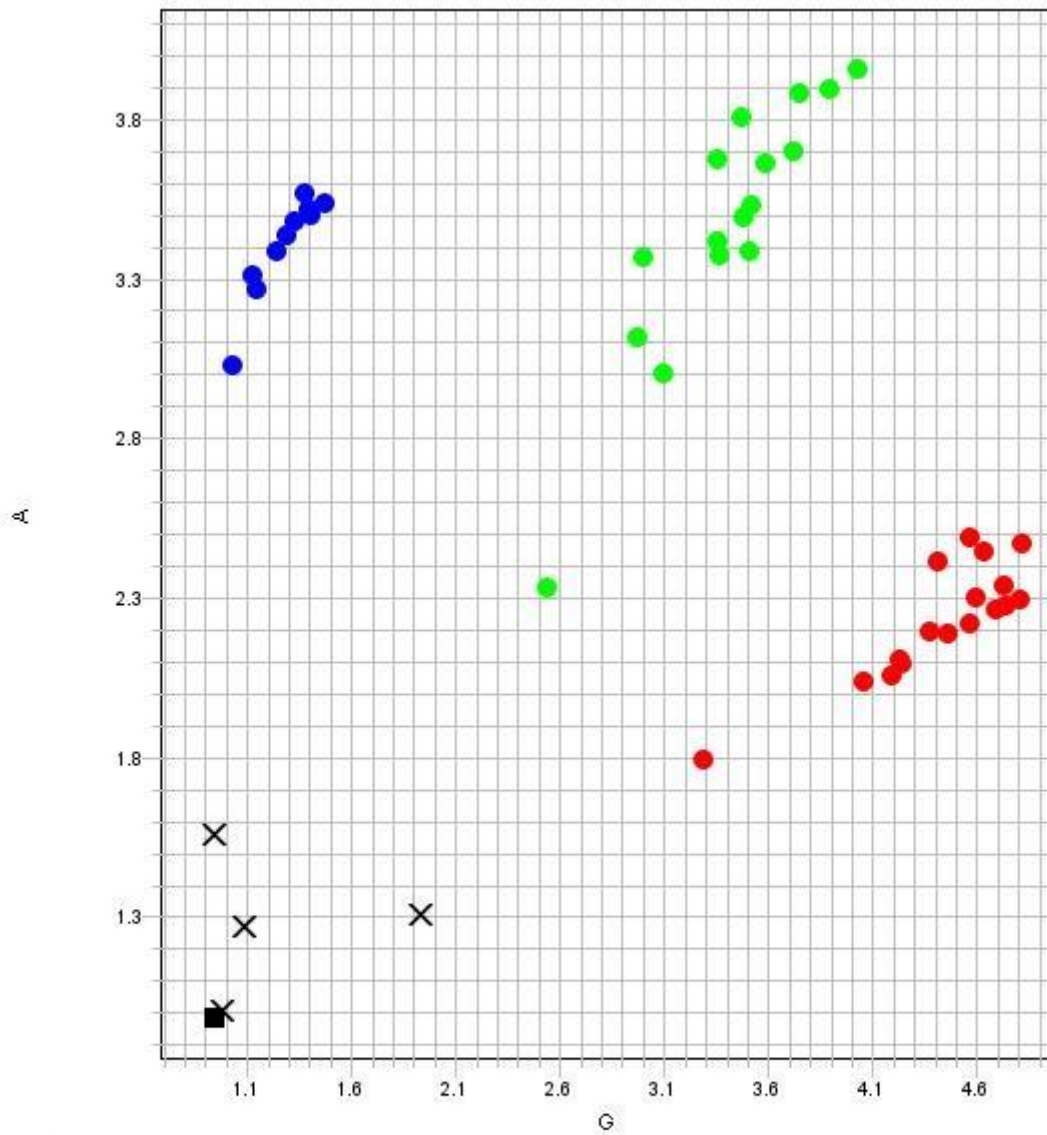
### Allelic Discrimination Plot



#### Legend

- Homozygous G/G
- Homozygous A/A
- Heterozygous G/A
- × Undetermined

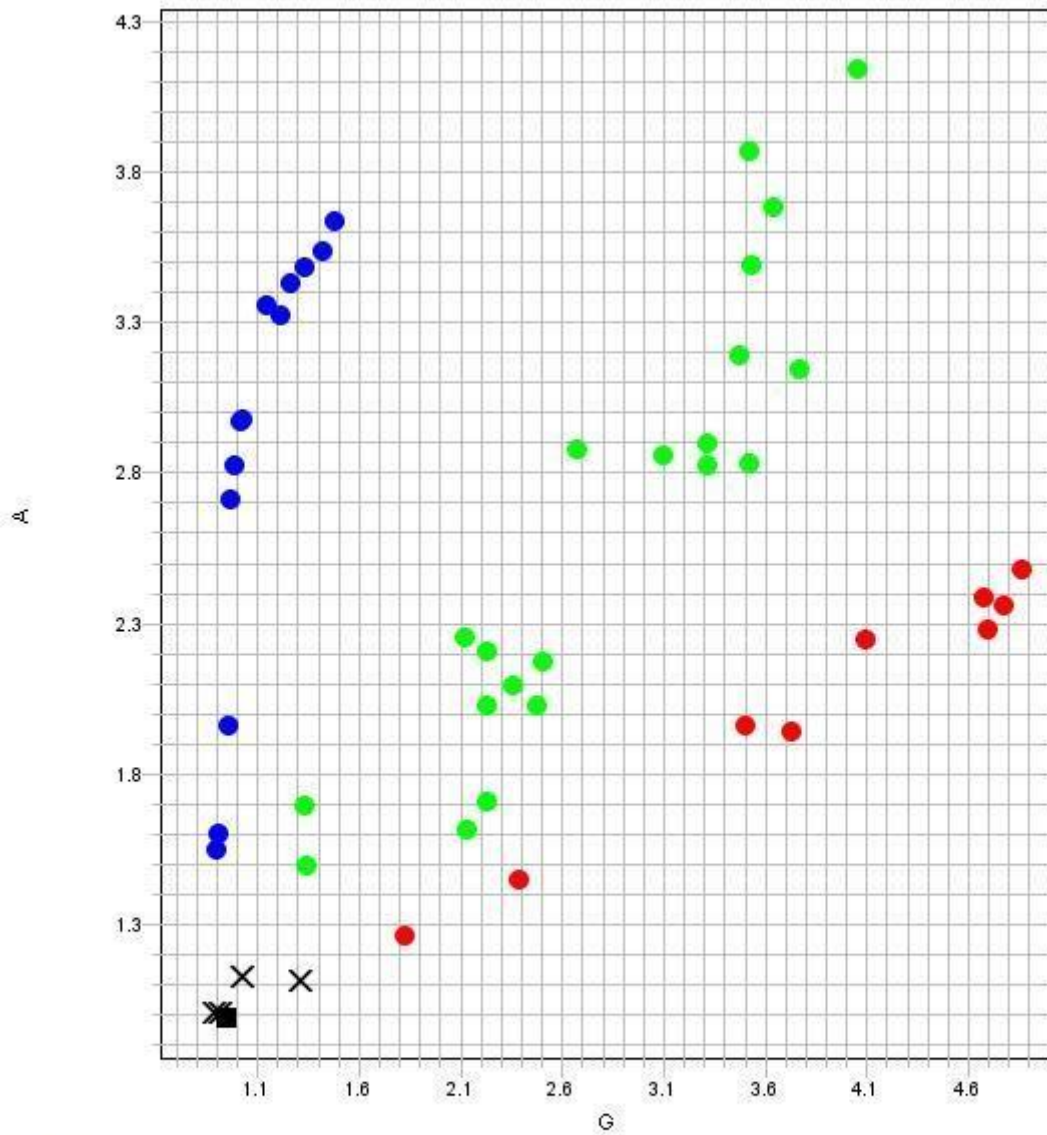
### Allelic Discrimination Plot



#### Legend

- Homozygous G/G
- Homozygous A/A
- Heterozygous G/A
- × Undetermined

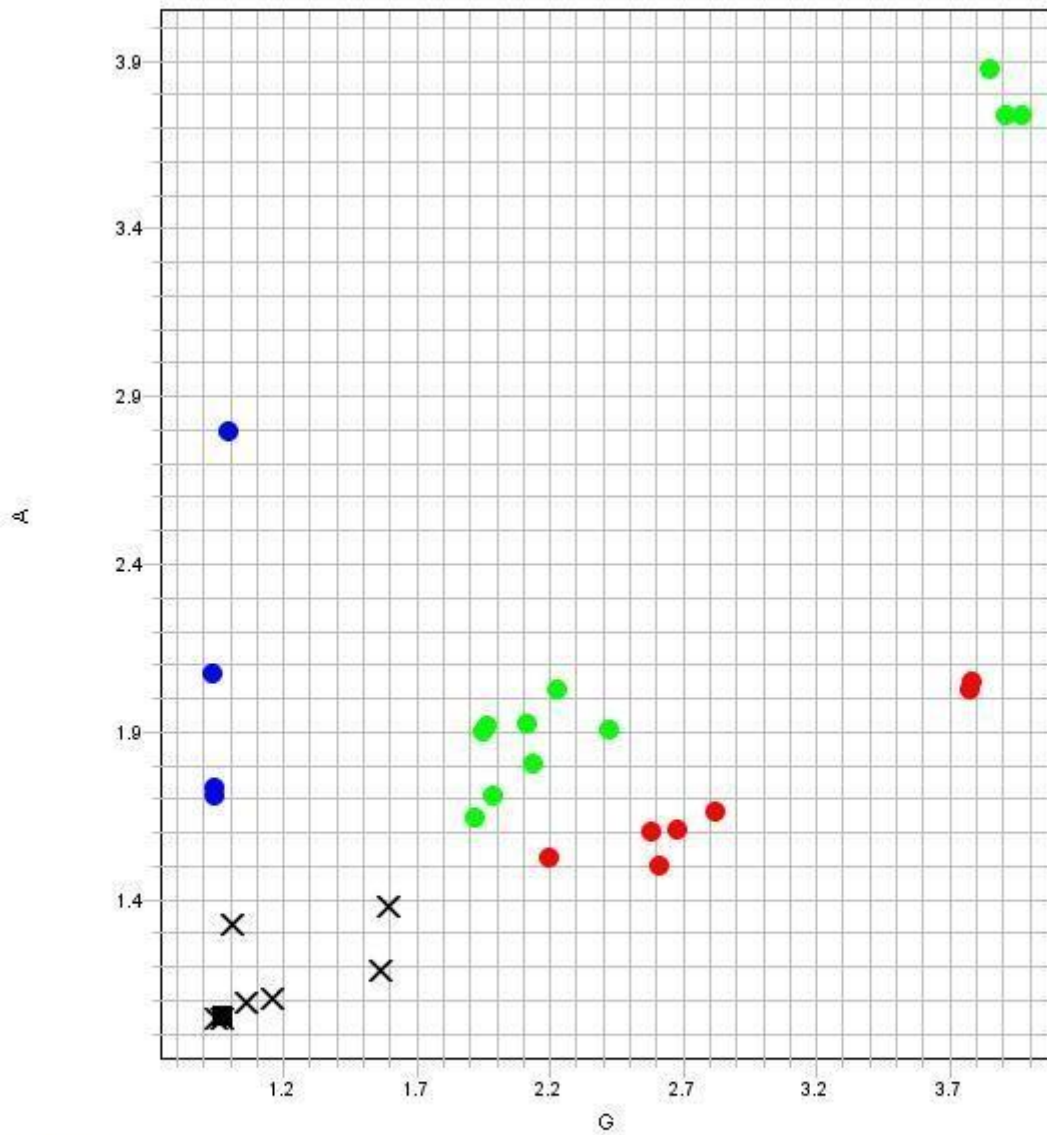
### Allelic Discrimination Plot



#### Legend

- Homozygous G/G
- Homozygous A/A
- Heterozygous G/A
- × Undetermined

### Allelic Discrimination Plot

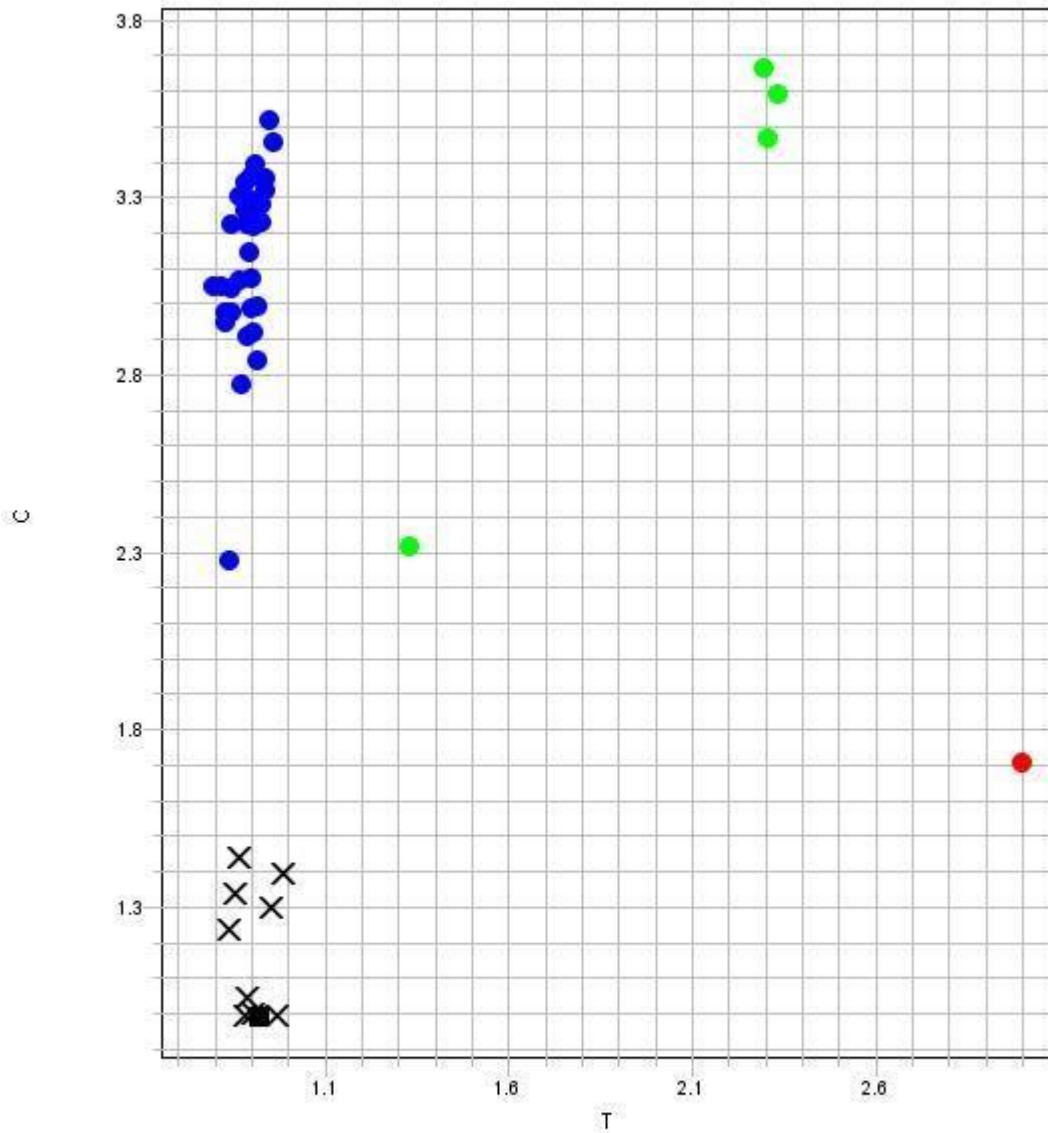


#### Legend

- Homozygous G/G
- Homozygous A/A
- Heterozygous G/A
- × Undetermined

rs2285932

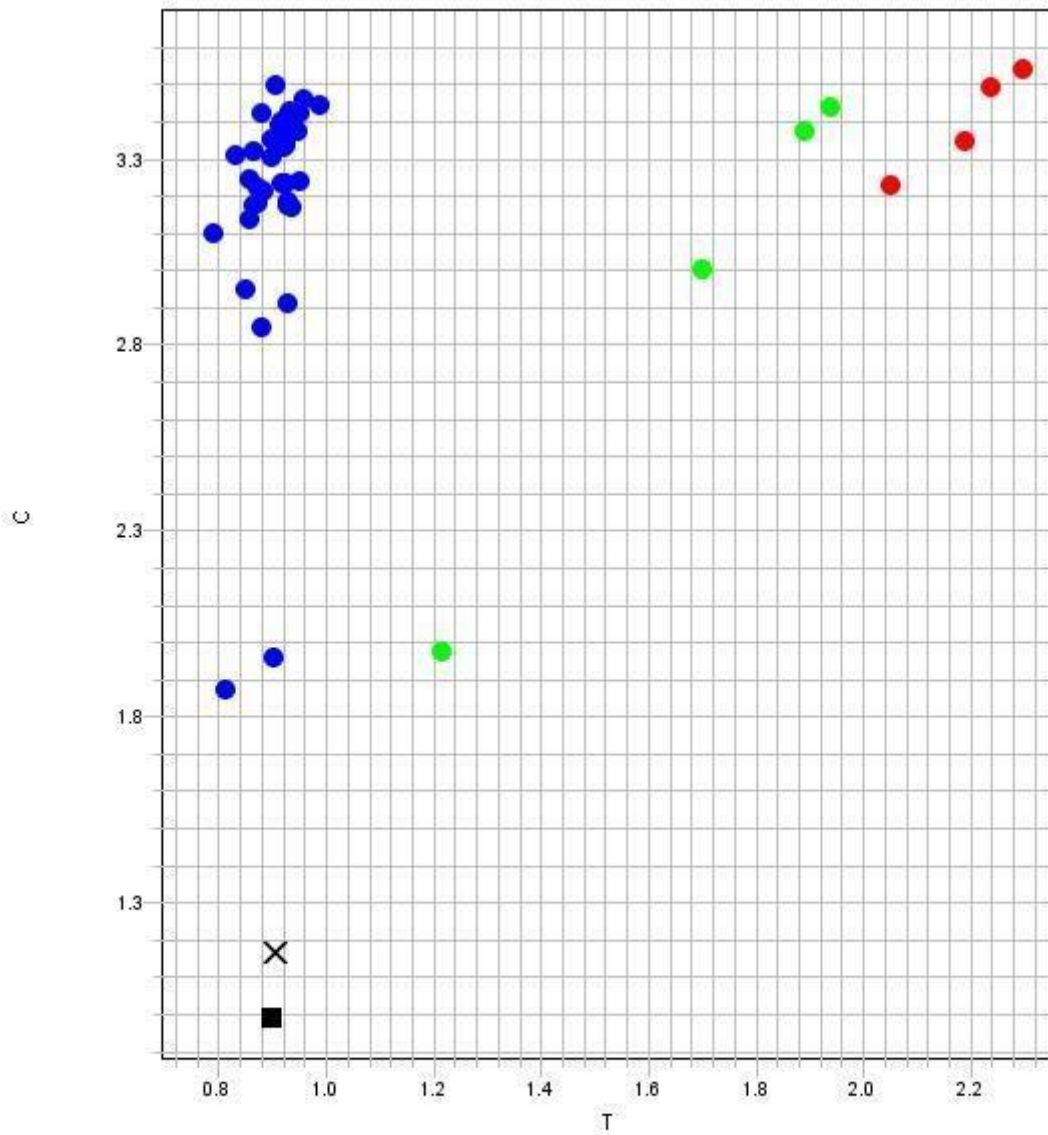
### Allelic Discrimination Plot



#### Legend

- Homozygous T/T
- Homozygous C/C
- Heterozygous T/C
- × Undetermined

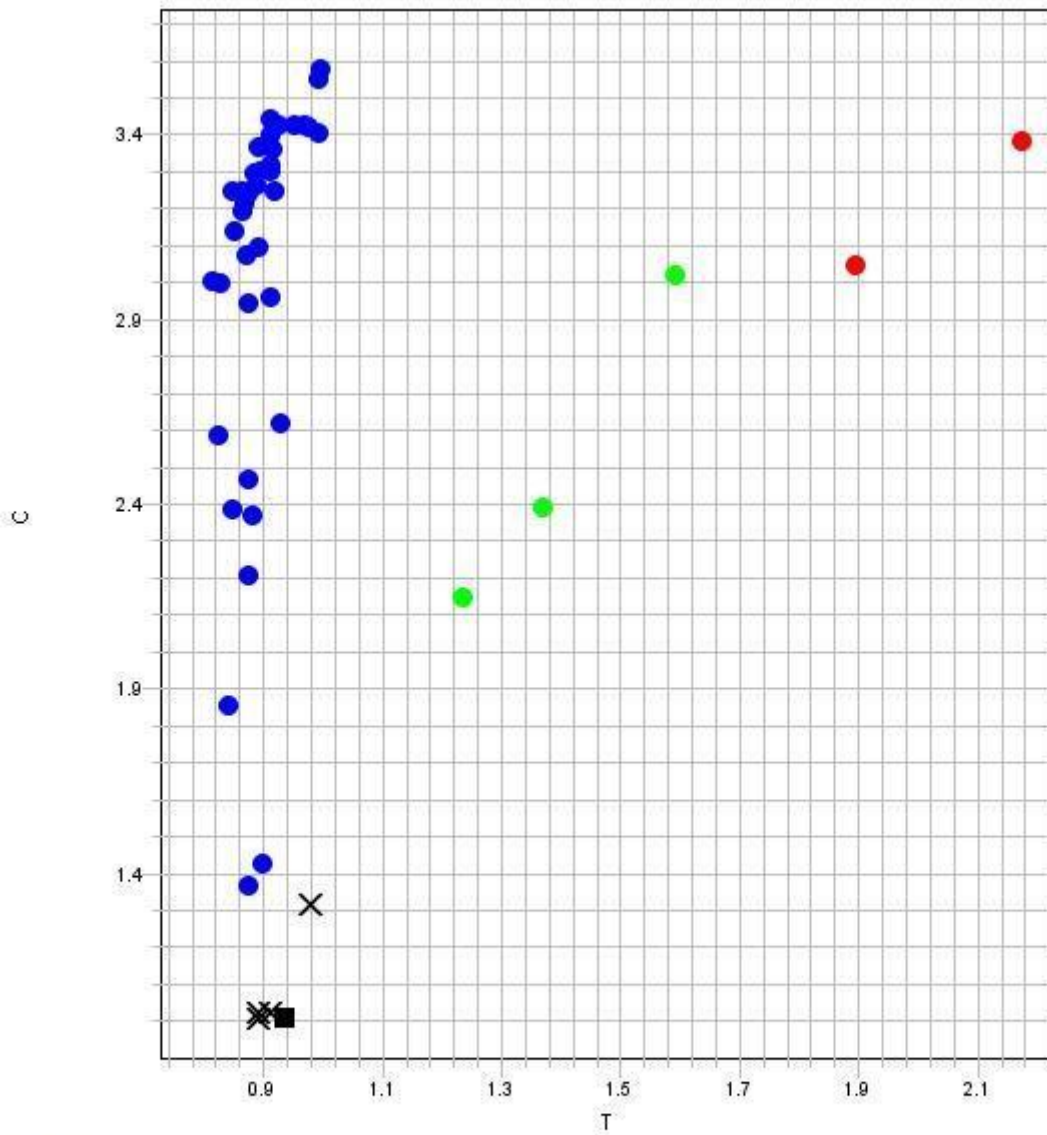
### Allelic Discrimination Plot



#### Legend

- Homozygous T/T
- Homozygous C/C
- Heterozygous T/C
- ✕ Undetermined

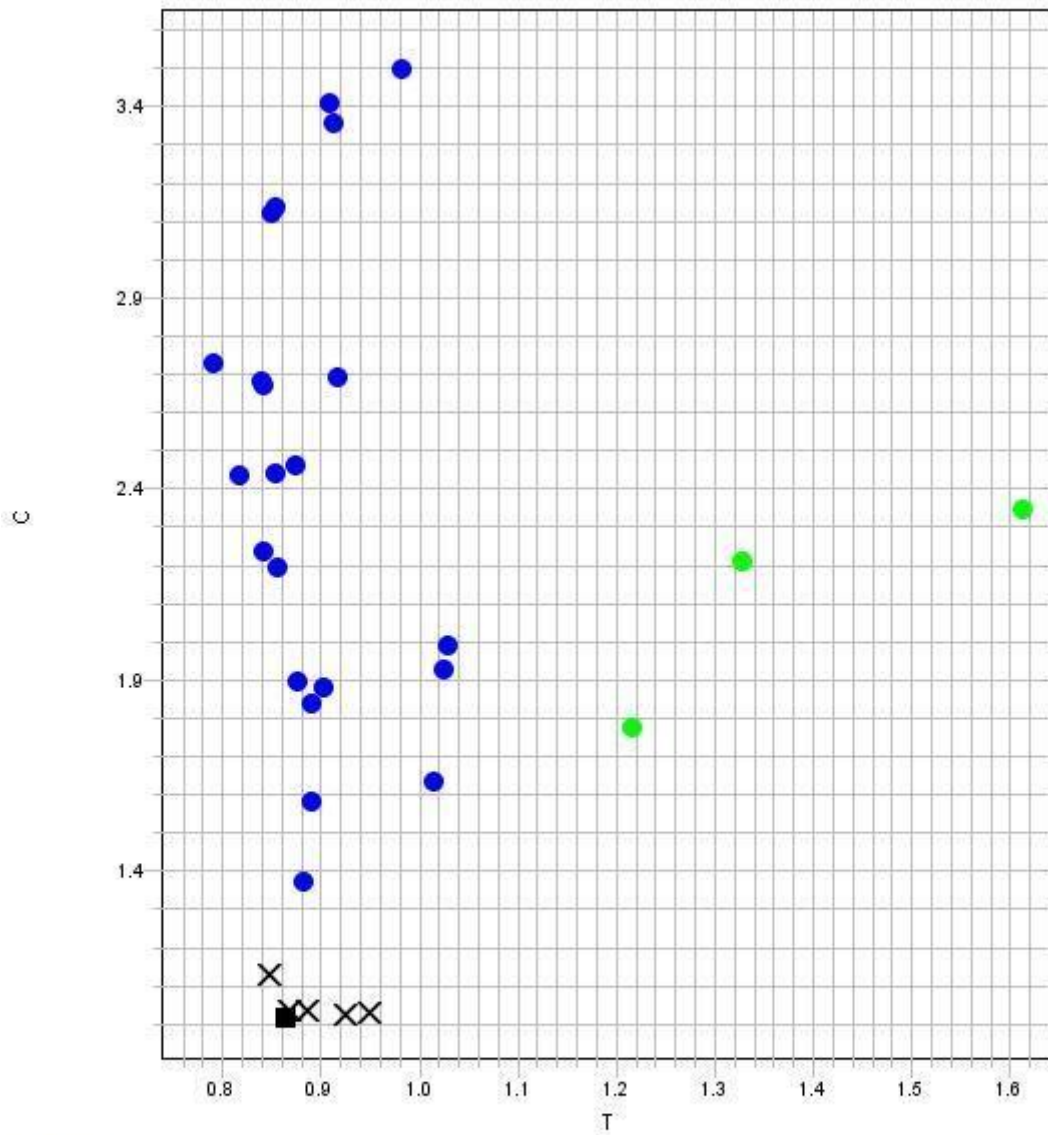
### Allelic Discrimination Plot



#### Legend

- Homozygous T/T
- Homozygous C/C
- Heterozygous T/C
- ✕ Undetermined

### Allelic Discrimination Plot



#### Legend

- Homozygous T/T
- Homozygous C/C
- Heterozygous T/C
- × Undetermined