

Polimorfismo -308A>G en la región promotora del gen del factor de necrosis tumoral alfa en población cubana

-308A>G polymorphism in the promoter region of the tumor necrosis factor alpha gene in the Cuban population

Francisco Sotomayor Lugo^{1*} <https://orcid.org/0000-0001-9854-8688>

Beatríz Marcheco Teruel¹ <https://orcid.org/0000-0001-6009-0405>

Kenia Rodríguez Martínez² <https://orcid.org/0000-0001-9972-3687>

Alejandro Esperón Álvarez¹ <https://orcid.org/0000-0002-6806-4874>

Ixchel López Reyes¹ <https://orcid.org/0000-0003-3387-2668>

Julia Azanza Ricardo³ <https://orcid.org/0000-0002-9454-9226>

¹Centro Nacional de Genética Médica. La Habana, Cuba.

²Hospital Clínico Quirúrgico “Hermanos Ameijeiras”. La Habana, Cuba.

³Universidad de La Habana, Instituto Superior de Tecnologías y Ciencias Aplicadas. La Habana, Cuba.

*Autor para la correspondencia: francisco@cngen.sld.cu

RESUMEN

Introducción: El factor de necrosis tumoral alfa (TNF α) es una citoquina proinflamatoria en cuyo gen se ha notificado el polimorfismo -308A>G. No existen informes genéticos poblacionales de esta variante en Cuba, que permitan caracterizar los perfiles inmunogenéticos a nivel molecular para su aplicación en estudios de asociación alélica.

Objetivos: Describir las frecuencias génicas y genotípicas del polimorfismo TNF α (-308A>G) en la población cubana.

Métodos: Se realizó un estudio observacional, descriptivo, transversal, entre octubre de 2017 y marzo de 2018, en 162 neonatos cubanos, de ambos sexos y sanos, para el pesquisaje neonatal de enfermedades metabólicas, cuyas muestras biológicas se conservaban en el banco de ADN del Centro Nacional de Genética Médica. La caracterización molecular de los genotipos fue realizada mediante un PCR-ARMS. Se utilizó el *software* GENEPOP 4.4 y el paquete estadístico STATISTICA 8.0 para el análisis de genética poblacional.

Resultados: La población estudiada no se ajustó al modelo de equilibrio de *Hardy Weinberg* para el gen evaluado. Las frecuencias génicas estimadas para el polimorfismo TNF α (-308A>G) fueron de 0,09 para el alelo A y de 0,91 para

el alelo G. El cálculo de las frecuencias genotípicas resultó en 0,03; 0,84 y 0,13, para las variantes AA, GG y AG, respectivamente.

Conclusiones: El alelo G y el genotipo GG para el polimorfismo TNF α (-308A>G) presentan mayor frecuencia en la población estudiada. El comportamiento de las frecuencias génicas de TNF α .A y las frecuencias genotípicas de los individuos TNF α .AA, lo definen como un alelo de baja prevalencia en la población.

Palabras clave: factor de necrosis tumoral alfa; genética de población; frecuencia alélica.

ABSTRACT

Introduction: Tumor necrosis factor alpha (TNF α) is a proinflammatory cytokine in whose gene -308A>G polymorphism has been reported. No population genetics reports of this variant are available in Cuba which would allow characterization of molecular immunogenetic profiles for their use in allelic association studies.

Objectives: Describe the gene and genotype frequencies of TNF α (-308A>G) polymorphism in the Cuban population.

Methods: A cross-sectional observational descriptive study was conducted from October 2017 to March 2018 of 162 healthy Cuban neonates of both sexes for neonatal screening of metabolic diseases, whose biological samples were kept in the DNA bank of the National Center for Medical Genetics. Molecular characterization of the genotypes was performed by PCR-ARMS. The software GENEPOP 4.4 and the statistics package STATISTICA 8.0 were used for population genetics analysis.

Results: The study population did not adjust to the Hardy-Weinberg equilibrium model for the gene evaluated. The gene frequencies estimated for TNF α (-308A>G) polymorphism were 0.09 for allele A and 0.91 for allele G. Estimation of genotype frequencies was 0.03, 0.84 and 0.13 for variants AA, GG and AG, respectively.

Conclusions: Allele G and genotype GG of TNF α (-308A>G) polymorphism display a higher frequency in the study population. The behavior of TNF α .A gene frequencies and the genotype frequencies of TNF α .AA individuals define it as a low-prevalence allele in the population.

Keywords: tumor necrosis factor alpha; population genetics; allele frequency.

Recibido: 04/04/2019

Aceptado: 24/10/2019

Introducción

El TNF α es una citoquina proinflamatoria funcional que pertenece a la familia del factor de necrosis tumoral. Esta citoquina es secretada principalmente por macrófagos y reconocida por los receptores TNFRSF1A/TNFR1 y TNFRSF1B/TNFR2. Estructuralmente, presenta 233 aminoácidos y una masa molecular de 25 644 Da. Está involucrada en un amplio espectro de procesos biológicos que incluyen la proliferación celular, diferenciación celular, apoptosis, coagulación y el metabolismo lipídico.⁽¹⁾

Los factores genéticos pueden ser determinantes en los niveles de TNF α , y varios polimorfismos del gen han sido asociados con la modificación en su producción. El mismo está ubicado dentro de la región de clase III del complejo mayor de histocompatibilidad (altamente polimórfico) en el *locus* 6p21.33, con una extensión de 2770 Kb y contiene 4 exones.^(1,2) Se han descrito seis polimorfismos de simple nucleótido (SNPs) en la región 5' del gen, entre los que se informa el TNF α (-308A>G) (rs1800629), y donde son los individuos que portan el alelo A los que presentan una mayor actividad transcripcional en comparación con aquellos que “cargan” el alelo común G.^(3,4,5)

En los individuos, los niveles de TNF α son variables, influyendo en el espectro de las respuestas inmunológicas e inflamatorias. Esta variación genética, relacionada con el aumento de la expresión del producto génico, ha sido de gran interés en muchos campos debido al papel determinante del TNF α en la respuesta inmune, lo que establece la existencia de asociación entre el polimorfismo TNF α (-308A>G) y la susceptibilidad a diversas enfermedades como asma bronquial, demencia, artritis, lupus eritematoso sistémico, malaria cerebral, entre otras, asumiendo el alelo A como factor de riesgo; sin embargo, los resultados han sido variables en diferentes grupos poblacionales del mundo.^(2,6,7)

Se reconoce que no existen informes genéticos poblacionales de esta variante en Cuba, por lo cual el presente estudio tiene como objetivo, describir las frecuencias génicas y genotípicas del polimorfismo TNF α (-308A>G) en la población cubana. Este estudio representa una etapa inicial para caracterizar los perfiles inmunogenéticos a nivel molecular en la población, y establecer las bases para posteriores estudios de asociación alélica que se desarrollen en el país.

Métodos

Se realizó un estudio observacional, descriptivo, transversal, en el Centro Nacional de Genética Médica, en el período comprendido entre octubre de 2017 y marzo de 2018, en neonatos cubanos a quienes se les realizó el tamizaje neonatal, para caracterizar molecularmente el polimorfismo TNF α (-308A>G).

Población y muestra

La población de estudio estuvo constituida por el total de recién nacidos vivos en el período de noviembre a diciembre de 2017, a los que se les realizó el tamizaje neonatal entre el quinto y décimo día de nacidos para pesquisa de enfermedades metabólicas, establecido por el Programa Cubano de Manejo, Diagnóstico y Prevención de Enfermedades Genéticas. Se incluyeron recién nacidos de ambos sexos y se excluyeron los que presentaron un resultado positivo para el diagnóstico de una de las enfermedades evaluadas. La muestra quedó representada por 162 individuos cubanos de ambos sexos de varias regiones del país. El número muestral estuvo condicionado por el análisis de factibilidad de la investigación. Para su selección se aplicó un muestreo aleatorio simple.

Se utilizaron muestras de sangre seca en papel de filtro conservadas en el banco de ADN del Centro Nacional de Genética Médica, cuyo propósito original era el tamizaje neonatal. Su manipulación fue evaluada y aprobada por el Comité de Ética de la institución, el que propuso un manejo codificado de la identidad.

Caracterización molecular

Se realizó la extracción manual de ADN en sangre seca en papel de filtro mediante la aplicación de resina *Chelating* (ácido iminodiacético), según el procedimiento normalizado de operaciones (PNO) de extracción de ADN del Departamento de Biología Molecular de la institución responsable.⁽⁸⁾ El ADN extraído fue analizado cualitativamente en un gel de agarosa al 1 % y posteriormente refrigerado a 4 °C hasta su utilización.

Para caracterizar molecularmente al polimorfismo TNF α (-308A>G) se estandarizó un PCR alelo específico (PCR ARMS: amplificación refractaria de mutaciones específicas). El diseño de los cebadores fue tomado según lo referido por *Vialard* y otros:⁽⁹⁾

- F1: 5'-ATAGGTTTTGAGGGGCATGA-3'
- F2: 5'-ATAGGTTTTGAGGGGCATGG-3'

– R: 5'-TCTCGGTTTCTTCTCCATCG-3'

Se amplificó una secuencia de 184 pares de bases en un PCR de 25 ciclos (1.º desnaturalización a 95 °C por 15 min; 2.º desnaturalización a 94 °C por 45 s; 3.º hibridación a 65 °C por 45 s y elongación a 72 °C por 45 s), que fue identificada en una electroforesis en geles de agarosa al 3 %.

Como control interno de amplificación se utilizó una región del gen FGFR3. Las secuencias del juego de cebadores fueron: 5'-AGGAGCTGGTGGAGGCTGA-3' y 5'-GGAGATCTTGTGCACGGTGG-3', con un producto de 164 pares de bases.

Análisis estadístico

Se utilizó el *software* GENEPOP 4.4 (2015) que implementa diferentes métodos tradicionales de análisis de genética poblacional, así como el paquete estadístico STATISTICA 8.0 (2007) para el análisis de datos.

Se determinaron las frecuencias génicas y genotípicas del polimorfismo TNF α (-308A>G). Estos datos fueron comparados con los referidos en otras investigaciones mediante la aplicación de la prueba de chi-cuadrado o el test exacto de Fisher. Se evaluó el equilibrio de Hardy-Weinberg (HW) y se determinó la existencia, o no, de exceso o deficiencia de heterocigóticos. Un valor de $p \leq 0,05$ fue considerado como estadísticamente significativo.

Resultados

En la siguiente figura se presenta la foto de la electroforesis en geles de agarosa al 3 %, mediante la cual se realizó la caracterización molecular del polimorfismo TNF α (-308A>G) en cada individuo de la población de estudio.

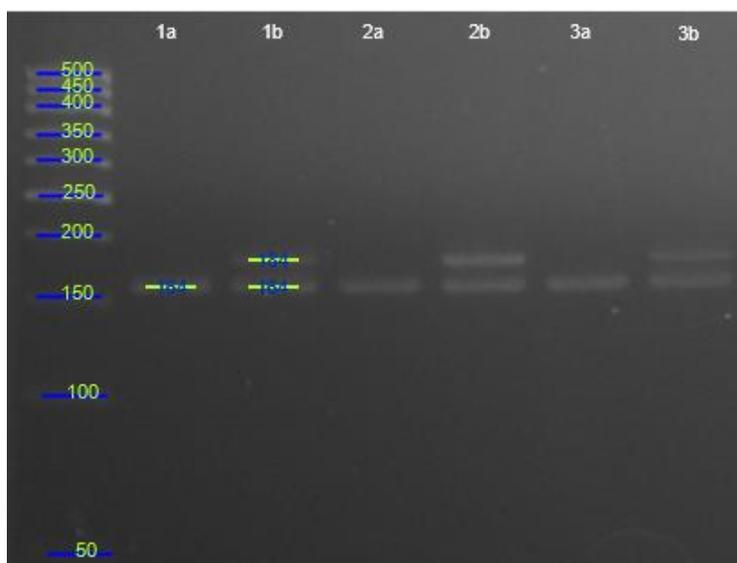


Fig. - Fotografía de la electroforesis de ADN en geles de agarosa. En el primer carril se evidencia el patrón de peso molecular de 50 pb. Cada dos carriles consecutivos se analiza un caso. El primer y segundo carril de cada muestra, identifica el alelo mutado y el alelo salvaje, respectivamente. La banda de 164 pb representa el control interno de amplificación y la banda de 184 pb representa el gen de interés. Caso 1, 2 y 3: individuos homocigóticos para el alelo G.

En la siguiente tabla se presentan las frecuencias genotípicas del polimorfismo TNF α (-308A>G).

Tabla - Distribución de individuos según el genotipo del polimorfismo TNF α (-308A>G)

Genotipo	Valores observados	Frecuencias genotípicas observadas	Valores esperados*	Frecuencias genotípicas esperadas
AA	4	0,03	1,26	0,01
AG	21	0,13	26,49	0,16
GG	137	0,84	134,23	0,83

*Corrección de Levene: evalúa la igualdad de varianzas para una variable calculada para dos o más grupos.⁽¹⁰⁾
(N = 162)

Las frecuencias génicas estimadas para el polimorfismo TNF α (-308A>G) fueron de 0,09 para el alelo A y de 0,91 para el alelo G.

Al aplicar el “test exacto de HW” se obtuvo que el valor de p para el polimorfismo TNF α (-308A>G) fue igual a 0,02. Este valor ($p \leq 0,05$) determinó el rechazo de la hipótesis nula y se asumió que la población de estudio no se ajustaba al modelo de equilibrio de HW para el gen evaluado.

El análisis estadístico de la población evidenció un déficit de heterocigóticos para el *locus* en estudio, con un valor de $p = 0,02$, que justificó el rechazo de la hipótesis nula para esta prueba. Estos resultados condicionaron que la prueba para evaluar un exceso de heterocigóticos no fuese significativa.

Discusión

El presente estudio no controla los efectos de la estratificación genética basada en el mestizaje étnico de la población cubana. Según lo referido por *Marcheco* y otros,⁽¹¹⁾ la determinación del origen étnico es importante para el desarrollo de los estudios genéticos poblacionales en Cuba, donde existe un origen ancestral muy heterogéneo. Esta limitación no permitió realizar comparaciones de frecuencias con otras poblaciones basadas en el origen étnico, por lo que se establecieron diferencias con otros estudios que abordan el tema e informan frecuencias génicas y genotípicas globales para este polimorfismo.

Las frecuencias alélicas del polimorfismo TNF α (-308A>G) se comportaron de forma similar a lo notificado internacionalmente en la *dbSNP Short Genetic Variations*. Se observó que el alelo G era el más frecuente, lo cual concuerda con lo presentado por dos estudios globales publicados por *NIH Polymorphism Discovery Resource* (NIHPDR).^(12,13)

En el primero se analizaron 80 individuos y se obtuvo una frecuencia génica de 0,93 y 0,08 para los alelos G y A, respectivamente. La frecuencia de homocigóticos AA fue de 0,03 y la de GG fue de 0,88, mientras que la de heterocigóticos presentó un valor de 0,10. Estas frecuencias genotípicas no mostraron diferencias estadísticas significativas con las enunciadas en este informe.⁽¹²⁾

El segundo estudio de NIHPDR incluyó 87 individuos con frecuencias génicas de 0,91 y 0,09 para los alelos G y A, respectivamente. Las frecuencias genotípicas respectivas fueron de 0,02, 0,85 y 0,13, para las variantes AA, GG y AG. Estos resultados son muy similares a los referidos en este trabajo, y no se evidenciaron diferencias estadísticamente significativas entre las frecuencias genotípicas.⁽¹³⁾

Llama la atención que la frecuencia del genotipo TNF α .AA fue igual a 0,03, que se reconoce asociado con un mayor riesgo para distintas enfermedades, según lo informado para otras poblaciones del mundo.^(14,15,16) Una implicación importante de la Ley de HW y que se cumple en la presente investigación es que, para un alelo poco frecuente, la frecuencia de heterocigóticos es mucho mayor que la del homocigótico poco usual. Este argumento es una evidencia de la dificultad para

eliminar los caracteres deletéreos recesivos de las poblaciones, ya que la mayoría se encuentra en estado heterocigótico y contra ellos no puede actuar la selección natural.⁽¹⁷⁾

La aplicación de la ley de HW contempla un *locus* de una población determinada en un tiempo dado. Una población puede hallarse en equilibrio de HW para algunos *loci* y en desequilibrio para otros. Además, las acciones de distintas fuerzas de cambio pueden anularse entre sí, lo que permite que la población alcance el equilibrio en un momento determinado. El resultado relacionado con que el gen evaluado no se ajuste al equilibrio de HW, puede ser un indicador de que el *locus*, requiere más de una generación para alcanzar el equilibrio, o ser la evidencia de los efectos de la estratificación genética de la población cubana generada por el mestizaje étnico.⁽¹⁷⁾

Conclusiones

La caracterización de los perfiles inmunogenéticos a nivel molecular en la población estudiada permitió conocer que el alelo G y el genotipo GG para el polimorfismo TNF α (-308A>G) presentan mayor frecuencia en la población estudiada, mientras que el comportamiento de las frecuencias génicas de TNF α .A y frecuencias genotípicas de los individuos TNF α .AA, lo definen como un alelo de baja prevalencia en la población.

El alelo G y el genotipo GG para el polimorfismo TNF α (-308A>G) presentan mayor frecuencia en la población estudiada. El comportamiento de las frecuencias génicas de TNF α .A y las frecuencias genotípicas de los individuos TNF α .AA, lo definen como un alelo de baja prevalencia en la población.

Referencias bibliográficas

1. Weizmann Institute of Science. GeneCards. Human Gene Database. 2018 [acceso: 20/06/2018]. Disponible en: <http://www.genecards.org/cgi-bin/carddisp.pl?gene=TNF>
2. Online Mendelian Inheritance in Man. Tumor Necrosis Factor. 2017 [acceso 15/05/2017]. Disponible en: <https://www.omim.org/entry/191160?search=necrosis%20tumoral%20factor&highlight=tumoral%20necrosi%20factor>
3. Hajeer A, Hutchinson I. Influence of TNFalpha gene polymorphisms on TNFalpha production and disease. Hum Immunol. 2001;(62):1191-9.
4. Wilson A, Symons J, McDowell T, McDevitt H, Duff. Effects of a polymorphism in the human tumor necrosis factor alpha promoter on transcriptional activation. Proc Natl Acad Sci USA. 1997;(94):3195-9.

5. Abraham L. Impact of the -308 TNF promoter polymorphism on the transcriptional regulation of the TNF gene: relevance to disease. *J Leukoc Biol.* 1999;(66):562-6.
6. Hohjoh H, Nakayama T, Ohashi J, Miyagawa T, Tanaka H, Akaza T, *et al.* Significant association of a single nucleotide polymorphism in the tumor necrosis factor-alpha (TNF-alpha) gene promoter with human narcolepsy. *Tissue Antigens.* 1999;(54):138-45.
7. Yucesoy B, Vallyathan V, Landsittel D, Simeonova P, Luster M. Cytokine polymorphisms in silicosis and other pneumoconioses. *Mol Cell Biochem.* 2002;(234-235):219-24.
8. Protocolo Normalizado de Operaciones de extracción de ADN. La Habana: Centro Nacional de Genética Médica, Biología Molecular; 2017.
9. Vialard F, El Sirkasi M, Tronchon V, Boudjenah R, Molina-Gomes D, Bergere M, *et al.* Tumor necrosis factor-308 polymorphism increases the embryo implantation rate in women undergoing in vitro fertilization. *Human Reproduction.* 2013;28(10):2774-83.
10. Levene H. On a matching problem arising in genetics. *Annals of Mathematical Statistics.* 1949;20:91-4.
11. Marcheco-Teruel B, Parra E, Fuentes-Smith E, Salas A, N. Buttenschøn H, Demontis D, *et al.* Cuba: Exploring the History of Admixture and the Genetic Basis of Pigmentation Using Autosomal and Uniparental Markers. *PLoS Genet.* 2014;10(7):e1004488.
12. dbSNP Short Genetic Variations. 2018 [acceso 25/07/2018]. Disponible en:
https://www.ncbi.nlm.nih.gov/projects/SNP/snp_ss.cgi?ss=ss6312900#gsum
13. dbSNP Short Genetic Variations. 2018 [acceso 25/07/2018]. Disponible en:
https://www.ncbi.nlm.nih.gov/projects/SNP/snp_ss.cgi?ss=ss6310583#gsum
14. Cuenca J, Pérez C, Aguirre A, Schiattino I, Aguillón C. Genetic polymorphism at position -308 in the promoter region of the tumor necrosis factor (TNF): implications of its allele distribution on susceptibility or resistance to diseases in the Chilean population. *Biol Res.* 2001;34:3-4.
15. Baena A, Leung J, Sullivan A, Landires J, Vasquez-luna N, Quiñones-Berrocal J, *et al.* TNFa promoter single nucleotide polymorphisms are markers of human ancestry. *Genes Immunity.* 2002;3:482-7.
16. Valente F, Tan C, Temple S, Phipps M, Witt C, Kaur G, *et al.* The evolution and diversity of TNF block haplotypes in European, Asian and Australian aboriginal populations. *Genes Immunity.* 2009;10:607-15.
17. Lardoeyt Ferrer R. Ley de Hardy Weinberg. En: Lardoeyt Ferrer R, Taboada Lugo N, Vázquez Sánchez V, Marcheco Teruel B, Rojas Betancourt

I, Herrera Martínez M, *et al.* Fundamentos de genética médica poblacional. La Habana: Editorial Ciencias Médicas; 2016. p. 20-30.

Conflicto de intereses

Los autores declaran que no tienen conflicto de intereses.

Contribuciones de los autores

Francisco Sotomayor Lugo: Trabajo de campo, revisión bibliográfica, aplicación de instrumentos de investigación, procesamiento estadístico, redacción del documento, revisión, corrección y aprobación final del manuscrito.

Beatriz Marcheco Teruel: Revisión bibliográfica, redacción del documento, revisión, corrección y aprobación final del manuscrito.

Kenia Rodríguez Martínez: Trabajo de campo, aplicación de instrumentos de investigación, redacción del documento, revisión, corrección y aprobación final del manuscrito.

Alejandro Esperón Álvarez: Trabajo de campo, aplicación de instrumentos de investigación, redacción del documento, corrección y aprobación final del manuscrito.

Ixchel López Reyes: Trabajo de campo, aplicación de instrumentos de investigación, aprobación final del manuscrito.

Julia Azanza Ricardo: Revisión bibliográfica, procesamiento estadístico, revisión y aprobación final del manuscrito.