

Identificación del polimorfismo c-173g en el gen del factor inhibitorio de la migración de macrófagos (MIF) por PCR a partir de ADN aislado de sangre periférica de pacientes con periodontitis apical

Velázquez Villafaña Marion (1), Alegría Torres Jorge Alejandro (2)

¹ [Lic. Químico Farmacéutico Biólogo, Universidad de Guanajuato] | Dirección de correo electrónico: [darial_ragnarok@hotmail.com]

² [Departamento de Farmacia, División de Ciencias Naturales y Exactas, Campus Guanajuato, Universidad de Guanajuato] | Dirección de correo electrónico: [ja.alegriatorres@ugto.mx]

Resumen

Introducción: MIF es una citoquina reguladora que promueve funciones proinflamatorias en células inmunes. Este estudio analizó la prevalencia del polimorfismo C-173G del gen MIF en 127 pacientes distribuidos en grupo A: Pacientes con Periodontitis Apical Crónica y grupo B: Pacientes con Absceso Apical Agudo o Absceso Fénix. **Materiales y métodos:** El ADN fue aislado a partir de sangre periférica de los 127 pacientes y se realizó discriminación alélica por qPCR usando sondas TaqMan fluorogénicas para determinar las frecuencias alélicas y genotípicas del polimorfismo. Se analizaron las diferencias en las distribuciones entre los grupos utilizando chi cuadrada y se calcularon OR. **Resultados:** El equilibrio Hardy-Weinberg de la distribución de alelos fue ($X^2=0.78$; $p=0.3745$). Las frecuencias alélicas fueron C=91(36 %) y G= 163 (64 %); genotípicas CC=14(13 %); CG= 63(46 %) y GG= 50(41 %). El alelo de riesgo no tuvo una distribución diferente entre el grupo A y B ($p=0.25$). No se obtuvieron valores estadísticamente significativos al OR entre los dos grupos confrontando a pacientes con genotipo CC contra CG+GG ($p=0.11$). **Discusión-conclusiones:** El polimorfismo C-173G no es un factor de riesgo asociado al aumento inflamatorio en periodontitis apical aunque hacen falta estudios de otros polimorfismos asociados al gen de MIF.

Abstract

Introduction: MIF is a regulatory cytokine that promotes proinflammatory functions in immune cells. This study analyzed the prevalence of polymorphism C-173G of the MIF gene in 127 patients divided into group A: Patients with Chronic Apical Periodontitis and group B: Patients with Acute Apical abscess or abscess Phoenix. **Materials and Methods:** DNA was isolated from peripheral blood of 127 patients and allelic discrimination was done by qPCR using TaqMan fluorogenic probes to determine the allele and genotype frequencies of the polymorphism. Differences in the distributions between groups were analyzed using chi square and calculated OR. **Results:** The Hardy-Weinberg equilibrium allele distribution was ($X^2=0.78$; $p=0.3745$). Allele frequencies were C=91(36%) and G=163(64%); Genotypes CC=14(13%); CG=63(46%) and GG=50(41%). The risk allele didn't have a different distribution between group A and B ($p=0.25$). No values were obtained statistically significant at the OR between the two groups confronting patients with CC against CG+GG genotype ($p=0.11$). **Discussion-Conclusions:** C-173G polymorphism isn't a risk factor associated with increased inflammatory apical periodontitis; although, other studies of polymorphisms associated to the MIF gene are needed.

Palabras Clave

Discriminación alélica; Factor Inhibitorio de la Migración de Macrófagos; Polimorfismo; Periodontitis apical; PCR en tiempo real.

INTRODUCCIÓN

Periodontitis apical

La periodontitis apical es producto de un conjunto de desórdenes inflamatorios en el tejido perirradicular causados por la presencia de una infección bacteriana mixta en el sistema de conductos radiculares [1].

La enfermedad puede evolucionar a distintos tipos: periodontitis apical aguda, dentro de las que se tienen el Absceso Apical Agudo y el Absceso Fénix los cuales presentan sintomatología, y la periodontitis apical crónica la cual es asintomática. Estos tipos de periodontitis apical pueden presentar una respuesta aguda inicial debido al proceso infeccioso el cual puede cambiar a una etapa crónica. Sin embargo, este cambio no siempre es el mismo, se puede presentar un proceso inflamatorio de larga duración que no desencadena signos ni síntomas dando una Periodontitis Apical Crónica en donde nunca se presentó un proceso inflamatorio agudo [2].

En esta serie de desórdenes inflamatorios existe un equilibrio entre los agentes patógenos de la enfermedad y el mismo sistema de defensa del hospedador por lo que, cuando hay una elevada cantidad de agentes causales y alta virulencia de ellos y/o cuando hay una baja defensa o alta defensa orgánica por parte del organismo humano, se puede desencadenar la agudización de la periodontitis apical que se lleva a cabo en el periapice del diente [3].

Citoquinas

Las citoquinas son proteínas de bajo peso molecular secretadas en respuesta a un estímulo inmune y están presentes en los tejidos periodontales [4]. Ellas inician acciones mediante la unión a receptores y atraen selectivamente a otras células (PMN, subconjuntos de linfocitos, monocitos/macrófagos y osteoclastos) que están involucradas en la inducción y mantenimiento de las reacciones inflamatorias y por lo tanto, la evolución clínica de las enfermedades [5].

Algunas de éstas toman un papel proinflamatorio y otras uno antiinflamatorio por lo que un desequilibrio puede provocar el progreso de la periodontitis apical [6].

MIF (Factor Inhibitorio de la Migración de Macrófagos)

MIF es una citoquina reguladora de la respuesta inmune innata la cual se considera un componente integral que inicia una respuesta antimicrobiana en el huésped, promoviendo funciones proinflamatorias en células inmunes. A pesar de que MIF es necesario en la defensa inmune contra procesos infecciosos, un aumento en su producción es capaz de generar respuestas de inflamación aguda severas.

Un polimorfismo reportado en la región promotora del gen de MIF es C-173G, consistiendo en una sustitución de una guanina por una citosina en la posición -173 [7]. Este polimorfismo se ha asociado con susceptibilidad a enfermedades autoinmunes e inflamatorias [8]. Por lo anterior,

resulta relevante determinar la prevalencia del polimorfismo C -173 G del gen de MIF en población mexicana, como un posible factor de riesgo genético que predisponga a la agudización de los procesos inflamatorios como ocurre en los pacientes con Periodontitis Apical (PA) que desarrollan Absceso Apical Agudo y Absceso Fénix, ya que esta variación genética aumenta la expresión de MIF exacerbando el proceso inflamatorio [9].

Discriminación alélica por PCR tiempo real

Un sitio del genoma en el cual los miembros individuales de una especie difieren en un solo par de bases se le denomina polimorfismo de un solo nucleótido (SNP, por sus siglas en inglés).

Los polimorfismos de un solo nucleótido son numerosos y están presentes a lo largo de todo el genoma. Al haber surgido de una mutación, los SNP se heredan en variantes alélicas aunque en general no producen una diferencia fenotípica [10]. Los SNP son el cambio de una base por otra en uno de los dos alelos. Los alelos son clasificados en alelo principal o silvestre y alelo raro o polimórfico. Debido a la diploidía de la especie humana, un individuo puede tener tres genotipos: homocigoto para el alelo común, heterocigoto u homocigoto para el alelo mutante [11].

PCR en tiempo real (qPCR) y sondas alelo específicas con fluorocromos (ASO)

La reacción de PCR (Reacción en cadena de la polimerasa) habitual se utiliza para amplificar un fragmento de ADN determinado y un instrumento sensible determina la cantidad exacta de ADN presente en la solución después de cada ciclo. En este proceso se calienta el ADN para separar sus dos cadenas, se unen cebadores cortos al ADN diana y la ADN polimerasa sintetiza nuevas cadenas a partir de ellos. Cada ciclo de PCR duplica la cantidad de ADN. Con frecuencia se

utiliza en la reacción una sonda que posee fluorescencia y que es específica para la secuencia de ADN de interés la cual es amplificada. La técnica se denomina PCR en tiempo real porque la cantidad de ADN amplificado se determina a medida que la reacción se produce. Para identificar un polimorfismo por PCR en tiempo real, se utilizan sondas de oligonucleótido alelo específicas (ASO). Estas sondas se son secuencias dúplex de ADN típicamente de entre 15-20 nucleótidos que hibridan sólo si la base complementaria es perfecta entre ellos de tal forma que una sonda es complementaria al alelo silvestre y la otra al alelo polimórfico o mutante [12].

El objetivo del proyecto fue determinar las frecuencias alélicas y genotípicas por qPCR del polimorfismo C-173G de MIF en un grupo de pacientes con PA dando continuación con un trabajo previo de la maestría en Endodoncia de la Universidad Autónoma de San Luis Potosí y la Universidad del Centro de México. En este proyecto del verano de la ciencia UG aumentamos el tamaño de muestra para robustecer este estudio de la vulnerabilidad genética.

MATERIALES Y MÉTODOS

Se seleccionaron 127 pacientes los cuales fueron diagnosticados por dos tesis de la Maestría en Endodoncia de la Universidad Autónoma de San Luis Potosí con las patologías de periodontitis apical crónica, absceso apical agudo o absceso fénix. Los pacientes se dividieron en dos grupos de estudio:

Grupo A: Pacientes con necrosis pulpar asociada a Periodontitis Apical Crónica.

Grupo B: Pacientes con necrosis pulpar asociada a Absceso Apical Agudo o Absceso Fénix.

Criterios de inclusión:

-Pacientes diagnosticados con pulpa necrótica asociada a Periodontitis Apical Crónica, Absceso Apical Agudo o Absceso Fénix.

-Mayores de 18 años.

-Ambos sexos.

-Pacientes que acepten y firmen el consentimiento informado.

Criterios de exclusión:

-Embarazo.

-Pacientes inmunosuprimidos.

Se realizó la toma de muestra por punción venosa de sangre periférica (7 mL), las cuales se colectaron en tubos con EDTA para evitar la coagulación. Se congelaron las muestras a -80°C hasta el aislamiento del ADN.

Extracción de ADN:

Se llevó a cabo la extracción de ADN de muestra de sangre periférica de pacientes seleccionados. El protocolo que se siguió fue establecido por García-Sepúlveda et al, 2010 [13].

Calidad y cuantificación del ADN:

Se realizó un análisis espectrofotométrico mediante lecturas a 230, 260 y 280 nm. Se realizaron diluciones a las muestras y el ADN se cuantificó directamente en la solución acuosa midiendo la absorbancia de luz ultravioleta. Los cocientes 260/230 y 260/280 fueron considerados en un rango de entre 1.4 y 2. La concentración de las muestras fue estandarizada a 30 ng/ μL .

Discriminación alélica por PCR en tiempo real (qPCR):

Se realizó la mezcla de reacción conteniendo 5 μL de enzima IQ multiplex power mix 2X Biorad®, 0.2 μL de cada sonda (Biosearch Technologies), 0.3 μL de oligonucleótido Directo y 0.2 μL de oligonucleótido Reverso (sondas y oligonucleótidos tuvieron una concentración final

de 10 μM). Cada muestra se realizó por duplicado en una placa de 96 pozos: se colocó 2 μL de la muestra de ADN correspondiente y 8 μL de la mezcla de reacción a cada pozo. Se colocó un control sin templado, se cubrió la placa con una membrana plástica autoadherible y se realizó la reacción de qPCR en el termociclador CFX96 Touch real-time PCR detection system Biorad®, bajo las siguientes condiciones de amplificación: 95°C por 3 minutos, y 40 ciclos a 95°C por 15 segundos y 59°C por 1 minuto.

Al finalizar la reacción de qPCR los datos se analizaron en el software Biorad CFX Manager versión 2.1 del equipo del equipo utilizado en el que se presentan los valores numéricos de la cantidad de fluorescencia liberada por los dos fluorocromos utilizados: QUASAR 705 y Cy5.

Análisis estadístico:

Los datos se analizaron en el programa SPSS para PC versión 19.0. Se determinó el equilibrio Hardy-Weinberg y Se cuantificó la magnitud de asociación con la Razón de Momios (OR) con un IC de 95%.

Se realizaron tablas de contingencia para analizar la distribución del alelo de riesgo entre los dos grupos y para el cálculo de la OR. Las diferencias se consideraron estadísticamente significativas con un valor de $p < 0.05$.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

De las 127 muestras analizadas se obtuvieron los siguientes resultados:

Frecuencias alélicas: C91 (35.83%) y G= 163 (64.17%)

Genotipos: CC=14 ; CG=63 ; GG=50

Equilibrio Hardy-Weinberg: $X^2=0.78$ ($p=0.3745$).

La discriminación alélica salió como se muestra en la IMAGEN 1.

La distribución del alelo de riesgo entre el grupo A y el grupo B no fue estadísticamente diferente entre los dos grupos ($p=0.25$). Al calcular los valores de OR confrontando a los grupos A y B con genotipo CC versus CC+CG, no se obtuvieron valores significativos ($p=0.11$).

Estos se presentan de forma clara, ordenada y concisa, evitando repetir información incluida en la sección anterior. Se debe incluir una interpretación con base a los razonamientos y se compara con los aportes de otros autores (referencias bibliográficas). Así el autor puede recomendar llevar a cabo ajustes en la metodología o la realización de estudios y cuidado futuros.

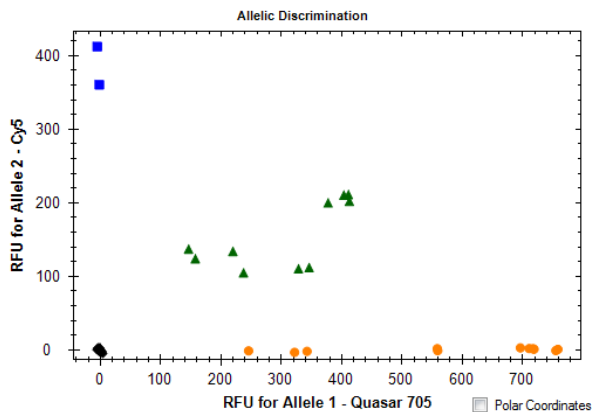


IMAGEN 1: Se muestra el resultado de la discriminación alélica analizada en el software Bio-Rad CFX Manager. Se distingue la distribución de los homocigotos para alelo polimórfico en cuadros azules (CC) y silvestre en círculos naranjas (GG) y para los heterocigotos en triángulos verde.

CONCLUSIONES

El polimorfismo C-173G del gen MIF no parece contribuir a la exacerbación de la inflamación (agudización), sin embargo, es necesario analizar los datos en función del sexo de los pacientes.

Asimismo, es necesario considerar otro polimorfismo de longitud en la región promotora del gen denominado CAAT₅₋₈ por tratarse de la secuencia de oligonucleótidos CAAT que va de 5 a 8 repeticiones en la región promotora del gen de MIF. La combinación de ambos polimorfismos podría estar modulando la respuesta inflamatoria de MIF por lo que resulta de interés explorarlo para investigar la vulnerabilidad genética de la población mexicana a procesos de agudización de la inflamación.

AGRADECIMIENTOS

A la Universidad de Guanajuato por el apoyo logístico, el financiamiento y el impulso, al estudiante de maestría Luis Carlos Martínez Garibay, a la Mtra. en Endodoncia Andrea Freer Rojas y a la Maestría en Endodoncia de la UASLP por permitir colaborar en ésta investigación, obtención de muestras y diagnóstico de pacientes y al Laboratorio de Investigación Molecular en Nutrición (LIMON) de la Universidad del Centro de México por el acceso y las facilidades para el trabajo experimental.

REFERENCIAS

- [1] Amaya, M.P., Criado, L., Blanco, B., Gómez, M., Torres, O., Flórez, L. (2013). Polymorphisms of pro-inflammatory cytokine genes and the risk for acute suppurative or chronic nonsuppurative apical periodontitis in a Colombian population. *Int Endod J*, 46(1). 71-78.
- [2] Nair, N.P. (1997). Apical periodontitis: a dynamic encounter between root canal infection and host response. *Periodontol* 2000,13. 12-48.
- [3] Leonardo, M.R. (2005). Endodoncia. Tratamiento de conductos radiculares. Principios técnicos y biológicos (5ª ed.). Sao Paulo: Artes Médicas Latinoamérica.
- [4] Ingle-Bakland. (2004). Endodoncia (5ª edición). México: McGraw-Hill Interamericana.

- [5] Cohen-Burns. (2002). Vías de la pulpa (8ª edición). Madrid: Mosby Co.
- [6] Weine, F.S. (2004). Endodontic Therapy (6ª edición). Saint Louis: Mosby Co.
- [7] Calandra, T., Bernhagen, J., Metz, C., Spiegel, L., Michael, A., Donnelly, T., Cerami, A., Bucala, R. (1995). MIF as a glucocorticoid-induced modulator of cytokine production. *Nat Rev Immunol.* 377.68-71.
- [8] Silva, T., Garlet, G.P., Fukada, S.Y., Silca, J.S., Cuhna, F.O. (2007). Chemokines in oral inflammatory diseases: apical periodontitis and periodontal disease. *J Dent Res.* 86. 306-19
- [9] Nair, N.P., Schroeder, H.E. (1985). Epithelial attachment at diseased human tooth-apex. *J Periodontal Res.* 20.293 -300.
- [10] Marton, I.J., Kiss, C. (1993). Characterization of inflammatory cell infiltrate in dental periapical lesions. *Int Endod J.* 26.131-36.
- [11] Ramachandran Nair, P.N., Pajarola, G., Schroeder H.E. (1996). Types and incidence of human periapical lesions obtained with extracted teeth. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod.* 81(1). 93-102.
- [12] Pierce, B.A. (2009). Genética: Un enfoque conceptual (3ª edición). España, Madrid: Ed. Médica Panamericana.
- [13] García Sepúlveda, C.A., Carrillo Acuña, E., Guerra Palomares, S.E., Barriga Moreno, M. (2010). Maxiprep genomic DNA extractions for molecular epidemiology studies and biorepositories. *Mol Biol Rep.* 37.1883-90.