

# Evaluación del Factor de Necrosis Tumoral (TNF-alfa) en pacientes peruanos con procesos periodontales

Evaluation of Tumor Necrosis Factor (TNF-alpha) in Peruvian patients with periodontal processes

Manuel Enrique Taboada Vega<sup>1</sup>, José Enrique Olivera García<sup>2</sup>, Óscar Valderrama Herrera<sup>3</sup>, Luis Cisneros Zárate<sup>3</sup>, Vilma Chuquihauccha Granda<sup>1</sup>, Soledad Reyes Soto<sup>1</sup>, Pedro Ballona Chambergo<sup>3</sup>

<sup>1</sup> Departamento Académico de Ciencias Básicas

<sup>2</sup> Facultad de Medicina Humana, UNMSM

<sup>3</sup> Departamento Académico Médico Quirúrgico

<sup>1,3</sup> Facultad Odontología UNMSM

## Resumen

El factor de necrosis tumoral (TNF) es un importante mediador de las reacciones inflamatorias y parece jugar un rol central en la patogénesis de varias enfermedades inflamatorias crónicas incluyendo la periodontitis. Se ha demostrado que existen diferentes tasas de síntesis de TNF alfa *in vitro* e *in vivo* entre los individuos, por lo que puede asociarse con la presencia de cierto polimorfismo genético. El presente estudio tiene la finalidad de estudiar el grado de polimorfismo del gen TNF-alfa (-308G/A) en una muestra de pacientes peruanos adultos y analizar la relación con los procesos periodontales severos. Para el estudio se colectaron 81 muestras de sangre con anticoagulante EDTA de personas comprendidas entre 25 y 52 años (promedio 47.5 ± 7.4). De los cuales 11 son de personas con procesos periodontales severos (promedio 35.2 ± 2.3). Se encontró una frecuencia mayor del genotipo GG (alelo G para el gen TNF-alfa-308) del 82.86% en personas sanas y 63.63% en personas con procesos periodontales. Mientras que el genotipo AA (alelo A para el gen TNF-alfa-308) que se relaciona a un mayor incremento de síntesis de TNF-alfa, fue de 18.8%, siendo un valor no muy significativo según la prueba chi-cuadrado. Los resultados están de acuerdo a algunos trabajos que encuentran asociación directa entre el polimorfismo del gen TNF-alfa con los procesos periodontales, pero no con otros que si lo asocian. Dado que la periodontitis es considerada una enfermedad multifactorial se discute el polimorfismo de TNF-alfa -308 (G/A) en pacientes peruanos.

## Abstract

The tumor necrosis factor (TNF) is an important mediator of the inflammatory reactions; it seems to play a central roll in the pathogenesis of several chronic inflammatory diseases including the periodontitis. It has been demonstrated that different rates exist from TNF alpha *in vitro* and *in vivo* between the individuals, so it can be associated with the presence of certain genetic polymorphism. The purpose of this investigation is to study the degree of polymorphism of the gene TNF-alpha (-308G/A) in samples of adult Peruvian patients and analyze the relationship with periodontal processes. For the study 81 blood samples with anticoagulant EDTA of people between 25 and 52 years were collected (47,5 average ± 7,4). 11 of them were people who had severe periodontal processes (average 35,2 ± 2,3). There was a greater frequency of genotype GG (G allele for the gene TNF-alpha-308) of the 82,86% in healthy people and 63,63% in people with periodontal processes. While the genotype AA (A allele for the gene TNF-alpha-308) that is related to a greater increase of TNF-alpha synthesis, was of 18,8%, this value was not very significant according to the chi-square test. The results are according to some works that find direct association between the polymorphism of the gene TNF-alpha with the periodontal processes, but not with others that do associate it. Since the periodontitis is considered a multifactorial disease the polymorphism of TNF-alpha -308 (G/A) in Peruvian patients is discussed.

Correspondencia:

Dr. Manuel Enrique Taboada Vega  
Facultad Odontología, UNMSM  
Av. Germán Amézcaga s/n, Lima, 1 Perú.  
e-mail: mtaboada@unmsm.edu.pe

**Palabras clave:** Periodontitis, TNF-alfa, polimorfismo, RFLP-PCR

**Key words:** Periodontitis, TNF-alpha, polymorphism, RFLP-PCR

## Introducción

Los genes pueden existir en diferentes estados o formas. Los genetistas se refieren a las diferentes formas de un gen como variantes alélicas o alelos. Las variantes alélicas de un gen difieren en su secuencia nucleotídica. Cuando un alelo específico ocurre en al menos 1% de la población, se dice que es un gen polimórfico. El genoma esta compuesto de una cadena lineal de

nucleótidos presentes en una molécula de doble cadena. La secuencia lineal de nucleótidos de una de las cadenas codifica para aminoácidos en forma de tripletes de codones. Muchas variantes alélicas involucran cambios de uno de los cuatro nucleótidos (A, T, G, C) por otro. Estos cambios alteran el triplete de codones que codifican para un aminoácido. Debido a la redundancia del triplete de codones algunos de estos codones cambian la secuencia

de codificación para el mismo aminoácido. Pero algunas variantes alélicas alteran la composición de aminoácidos del producto génico. El cambio de nucleótido es muy raro y no está presente en muchos individuos, pero si existe se denomina mutación. En contraste a la mutación, el polimorfismo genético es usualmente considerado como variantes normales del gen en la población. Cuando un cambio de nucleótido ocurre en un codón, puede

o no cambiar el aminoácido codificado por aquel codón. Cuando un nucleótido cambia en un codón y no altera el aminoácido se dice que es "silencioso" y usualmente no tiene consecuencias biológicas. Consecuentemente los productos de proteínas específicas de diferentes alelos pueden funcionar diferentemente. Estas diferencias en el funcionamiento biológico de diferentes proteínas puede ser incrementada por ciertas exposiciones ambientales (p.ej. dieta, tabaco, flora microbiana). Si la proteína afectada funciona en un proceso biológico, p.ej. respuesta inflamatoria en periodontitis por exposición de agentes microbianos específicos, ciertos polimorfismos de las personas pueden incrementar o disminuir su riesgo para el desarrollo de una enfermedad. Si una variante particular génica contribuye al fenotipo de una enfermedad dependerá de la magnitud de la alteración génica del producto. Millones de variantes genéticas han sido identificados en los humanos (NCBI: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>). La mayoría son cambios de un solo nucleótido (SNP's) que ocurren en los genes y que parecen cambiar la función de la proteína, pero la mayoría de ellos no parecen afectar el producto génico.

La periodontitis es una enfermedad que inicialmente es causada por bacterias orales. Primariamente la enfermedad afecta el tejido conectivo que soportan los dientes y es la mayor causa de pérdida de dientes en los adultos. Se ha reportado que la forma más común de periodontitis afecta entre el 30-40% de la población mundial adulta y aproximadamente el 10% de los sujetos desarrolla una enfermedad severa.<sup>10</sup> Un factor importante para el desarrollo de la periodontitis es el factor genético que se estima contribuye en un 50%.<sup>9</sup> La etiopatogénesis de la periodontitis parece ser multifactorial e involucra una serie de eventos de respuesta por parte del hospedero, entre los cuales existe una reacción inflamatoria e inmunológica específica. Un elemento a evaluar es la citokina proinflamatoria TNF-alfa, producida por monocitos/macrófagos en forma temprana en la respuesta inflamatoria. Esta citokina estimula la resorción del hueso en forma directa<sup>7</sup> y promueve la liberación de enzimas tipo metaloproteinasas, que destruyen la matriz extracelular de la gingiva, ligamiento periodontal y el hueso alveolar.<sup>6</sup> Se ha encontrado que en adultos japoneses(11) el gen TNF-alfa presenta una mutación de cambio de guanina por adenina en la posición 308, correlacionándolo a un incremento transcripcional de hasta ocho veces sobre la tasa normal de producción del gen normal<sup>14</sup> que podría favorecer el desarrollo de periodontitis.

El objetivo de este estudio es analizar un sector del gen TNF-alfa (TNF- $\alpha$ -308) con muestras de ADN de pacientes peruanos que presentan periodontitis severa y de ésta manera determinar si se puede establecer una relación directa de esta enfermedad con el marcador en estudio.

## Material y Método

**Muestra:** de los pacientes que acuden a la clínica central de la Facultad de Odontología UNMSM, se seleccionaron 81 pacientes, de los cuales 11 presentaban problemas periodontales avanzados, periodontitis avanzada, constituyendo el grupo de estudio y 70 considerados sanos, periodontal y sistémicamente.

**Criterios de inclusión:** no presentar enfermedad sistémica. No estar recibiendo ningún tipo de medicación.

Todos los sujetos dieron el consentimiento informado para participar en el estudio.

**Extracción de ADN :** fue extraído a partir de sangre periférica tratada con EDTA. Los linfocitos fueron lavados en buffer tris-EDTA (20:5).

**RFLP-PCR:** Para la determinación de los genotipos de polimorfismos -308G/A se aplicó la técnica de RFLP-PCR desarrollada por Wilson, AG. et al. (1993)(13) modificado por Folwaczny, MG. et al (2004) (1) y estandarizado para nuestras condiciones de laboratorio. Se usó los siguientes partidores: 5'- AGGCAATAGGTTTTGAGGGCCAT-3' (directo) y 5'-ACACTCCCATCCTCCCGGCT-3' (reverso). Los nucleótidos subrayados difieren de la secuencia original, con el fin de crear, dos sitios de restricción reconocibles posteriormente por las enzimas NcoI. Los ensayos de PCR fueron realizados en un termociclador MJResearch PT100, usando 100 ng de ADN genómico en un volumen final de 50  $\mu$ l. La reacción PCR contenía buffer 10X (Promega) y 5U de Taq polimerasa, así como una concentración final de 0.2 pM de cada partidador, 0.2 mM de cada

dNTP y 3 mM de MgCl<sub>2</sub>. La reacción PCR se inició con un paso de desnaturalización (95°C/15 min) seguido de 35 ciclos (desnaturalización a 94°C/30 s, hibridación a 52°C/30 s y extensión a 72°C/30 s). Un volumen de 10  $\mu$ l del producto de PCR se incubó a 37°C durante 12 h con enzimas de restricción y se resolvió mediante electroforesis en geles de agarosa 2.5% para la visualización de fragmentos. Específicamente, el polimorfismo -308G/A se determinó mediante la incubación con 1.2U de la enzima NcoI (Fermentas). En este polimorfismo, el genotipo homocigoto para el alelo salvaje G generó fragmentos de 20 y 80 pares de bases, mientras que el genotipo homocigoto para el alelo A generó un fragmento no digerido de 107 pares de bases. La mayoría de los reactivos de PCR fue de la marca Promega.

**Análisis Estadístico:** Se calcularon las frecuencias alélicas y genotípicas por conteo directo y se evaluó la concordancia de la distribución genotípica con el equilibrio Hardy-Weinberg por la prueba chi-cuadrado de Pearson. Las diferencias entre los grupos de estudio fueron evaluadas con la prueba Fisher.

## Resultados

La Tabla 1 resume el número de personas analizadas por RFLP-PCR, así como los genotipos obtenidos para cada grupo con procesos periodontales y grupo control.

Se indica las frecuencias alélicas y genotípicas del polimorfismo estudiado. El polimorfismo G-308A no presenta frecuencias genotípicas concordantes con la Ley de Hardy-Weinberg según la prueba de chi-cuadrado de Pearson.

En la Tabla 1 se observa que el genotipo encontrado en la población en estudio, mayoritariamente es GG, siendo los genotipos GG y GA homocigotos y heterocigotos normales para la población. El Genotipo AA, en el cual, la variante alélica presenta una mutación en la posición -308, y por ello, la enzima NcoI no lo digiere, esta relacionado a pacientes con excesivo incremento de síntesis de TNF-alfa. Pero, según los resultados estadísticos, existe poca relación significativa entre los grupos enfermos y control. Se observa que el genotipo GG normal tiene un 63.63% con respecto al genotipo AA (18.18%). En cuanto a las frecuencias alélicas, el alelo G "normal" tiene un 27.72% presente entre las personas que desarrollan procesos periodontales, con respecto al gen A (27.27%). Por otro lado es interesante que el alelo A sea muy bajo entre las personas sanas (Tabla 2).

Tabla 1. Distribución de los diferentes genotipos del gen -308 TNF-alfa (G/A) obtenidos de personas adultas sana y con procesos periodontales

Genotipos	Con procesos Periodontales (%)	Control (%)
GG	7 (63.63)	58 (82.86)
GA	2 (18.18)	12 (17.14)
AA	2 (18.18)	0

Las diferencias entre los genotipos no fue significativa para las proporciones Hardy-Weinberg mediante la prueba chi cuadrado de Pearson.  $p < 0.228$

**Tabla 2. Frecuencia de los alelos del gen -308 TNF- $\alpha$  (G/A) obtenidos de personas con procesos periodontales**

Genotipos	Con procesos Periodontales (%)	Control (%)
Frecuencias alélicas		
G	16 (72.72)	128 (91.42)
A	6 (27.27)	12 (8.57)

Las diferencias entre los grupos no fue significativa mediante la prueba exacta de Fisher ( $p < 0.193$ ).

### Discusión

Se han descrito diferentes polimorfismos en la región promotora del gen TNF- $\alpha$  humano algunos de los cuales se han hallado correlación con diferentes enfermedades multifactoriales como la periodontitis<sup>1,12</sup>. En el gen TNF- $\alpha$  se ha observado que existe un cambio de guanina (alelo G) por adenina (alelo A) en la posición -308 lo cual conduce a un incremento de transcripción de TNF- $\alpha$  hasta tres veces bajo estimulación con lipopolisacárido bacteriano.<sup>8</sup> En consecuencia, individuos que son homocigotos para el alelo A TNF- $\alpha$ -308 (adenina en posición -308) tienen altos niveles de TNF- $\alpha$  circulantes que los homocigotos para el alelo G del gen TNF- $\alpha$ .<sup>2</sup> También se ha determinado que neutrófilos orales de pacientes de alelo A con periodontitis producen significantes cantidades de TNF- $\alpha$  cuando se comparan con individuos normales (de alelos G).<sup>5</sup> Por ello, se propuso que este genotipo AA puede ser un marcador de pronóstico para la periodontitis.

En el presente estudio, no se ha podido establecer una diferencia significativa

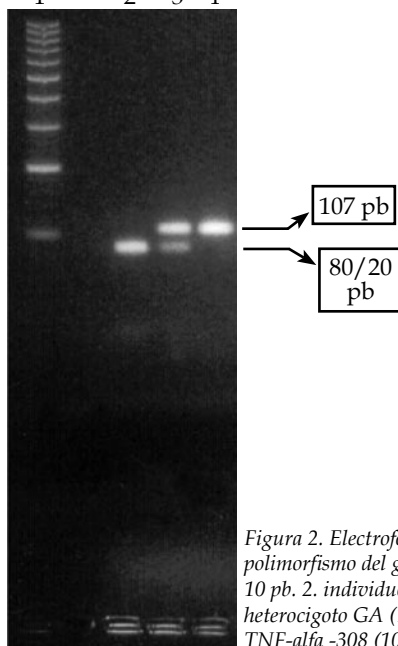


Figura 2. Electroforesis en agarosa al 2.5% que muestra el polimorfismo del gen TNF- $\alpha$  (-308) 1. Marcador de ADN de 10 pb. 2. individuo homocigoto GG (80/20 pb), 3. Individuo heterocigoto GA (107/80/20 pb), 4. Individuo homocigoto AA para TNF- $\alpha$  -308 (107 pb).

con respecto a la distribución de alelos o genotipos entre pacientes con procesos periodontales y el grupo control.

Otros estudios revelan una alta frecuencia del alelo A TNF- $\alpha$ -308 tanto para pacientes con periodontitis como para controles.<sup>5</sup> Mientras que otros han establecido mas relación de alelos G con periodontitis. Aun faltan desarrollar mas estudios, por cuanto la periodontitis crónica, si bien tiene un fondo epigenético inherente al paciente, también están involucrados factores multifactoriales muy compleja aun no dilucidada.

Por otro lado la selección de individuos para el estudio, y la poca muestra de pacientes con procesos periodontales podría también haber influido en el resultado. Por ello, la continuación de los estudios deberá enfocarse más específicamente en seleccionar paciente con periodontitis crónica como recomienda Flemming (1999).<sup>3</sup>

Al término del estudio se llegó a las siguientes conclusiones:

- Existe un alto polimorfismo importante del gen TNF- $\alpha$  -308 en los pacientes con periodontitis frente al grupo control entre hombres y mujeres.
- La asociación de este polimorfismo al número de casos con periodontitis es poco significativo, no obstante, el número de casos es poco lo cual estaría influyendo en el resultado.
- Nuestros resultados va de acuerdo con los obtenidos en poblaciones japonesas y brasileñas y en desacuerdo con lo obtenido para poblaciones europeas.

### Referencias bibliográficas

- Beutler, B. and Cerami, A. The biology of TNF a primary mediator of the host response. Annual Review of Immunology 1989;7:625-655.
- Bouma, G., Crusius, J. B. A., Pool, M. O., Kolkman, J. J., Von Blomberg, B. M. E., Kostense, P. J., Giphart, M. J., Schreuder, G. M. T., Meuwissen, S. G. M. & Peeters, A. S. Secretion of tumor necrosis factor a and lymphotoxin a in relation to polymorphisms in the TNF genes and HLA-DR alleles. Relevance for inflammatory bowel disease. Scandinavian Journal of Immunology 1996;43:456-463.
- Flemming, TF. Periodontitis. Annals of Periodontology 1999;4:32-37.
- Folwaczny, M. Glas, J., Torok, H, Mende M., and Ch. Folwaczny. Lack

of association between the TNF $\alpha$  G-308 A promoter polymorphism and periodontal disease. Clin Periodontol 2004;31:449-453.

- Galbraith, G. M., Hendley, T. M., Sanders, J. J., Palesch, Y. & Pandey, J. P. Polymorphic cytokine genotypes as markers of disease severity in adult periodontitis. Journal of Clinical Periodontology 1999;26:705-709.
- Kilian, M, Frandsen EVG, Haubek, D and K. Poulsen. The etiology of periodontal disease revisited by population genetic analysis. Periodontology 2006;42:158-179.
- Kobayashi, K. Takahashi, N, Jimi, E. Udagawa, N. Takami M., Kotake S., Nakagawa, N. Kinoshita, M. Yamaguchi, K. Shima, N. Yasuda H., Morinaga, T., Higashio K, Martin TJ, and Suda T. Tumor necrosis factor alpha stimulates osteoclast differentiation by a mechanism independent of the ODF/RANKL-RANK interaction. Journal of Experimental Medicine. 2000;191:275-286.
- Kroeger, K. M., Steer, J. H., Joyce, D. A. & Abraham, L. J. Effects of stimulus and cell type on the expression of the -308 tumour necrosis factor promoter polymorphism. Cytokine 2000;12:110-119.
- Michalowicz, BS, Diehl, SR, Gunsolley, JCC., Sparks, BS. Brooks, CN, Koertge, T.E. Califano, JV, Burneister, JA and Schenkein, HA. Evidence of a substantial genetic basis for risk of adult periodontitis. Journal of Periodontology 2000;71:1669-1707.
- Papapanou, PN and Lindle J. Epidemiology of periodontal disease. In: Lindhe. J. Karring T. & Lang NP. (eds). Clinical Periodontology and Implant Dentistry, 4th edition. UK; Blackwell Munksgard. 2003.
- Soga, Y, Nishimura, F, Ohyama, H., Maeda, H., Takashiba Sh, and Murayama, Y. Tumor necrosis factor-alpha gene (TNF-a) -1031/-863,-857 single-nucleotide polymorphisms (SNPs) are associated with severe adult periodontitis in Japanese. Journal of Clinical Periodontology 2003;30:524-531.
- Verweij, CL. Tumor necrosis factor gene polymorphisms as severity markers in rheumatoid arthritis. Annals of Periodontology 1999;4:39-52.
- Wilson AG, De Vries, N, F. Pociot, F, Di Giovine, FS, Van der Putte, LBA and G. W. Duff. An Allelic Polymorphism within the Human Tumor Necrosis Factor  $\alpha$  Promoter Region Is Strongly Associated with HLA A1, B8, and DR3 Alleles J. Exp. Med. 1993;177:557-560.
- Wilson, AG and Di Giovine FS. Genetics of TNF- $\alpha$  in autoimmune infectious and neoplastic disease. Journal of Inflammation 1995;45:1-12.

Recibido : 07-05-2007

Aceptado para publicación: 25-05-2007