



CIENCIAS BÁSICAS BIOMÉDICAS
ARTÍCULO ORIGINAL

Polimorfismo +405G>C del gen del factor de crecimiento de endotelio vascular en población cubana

Vascular Endothelial Growth Factor gene +405G>C polymorphism in the Cuban population

Francisco Sotomayor Lugo^{1*}, Julia Azanza Ricardo², Ixchel López Reyes³, Vivian Veiga Loyola⁴,
Yoandra Crespo Ferrá⁴

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

²Universidad de Ciencias Médicas de La Habana. La Habana, Cuba.

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

⁴Hospital Clínico Quirúrgico "Hermanos Ameijeiras". La Habana, Cuba.

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

Cómo citar este artículo

Sotomayor Lugo F, Azanza Ricardo J, López Reyes I, Veiga Loyola V, Crespo Ferrá Y. Polimorfismo +405G>C del gen del factor de crecimiento de endotelio vascular en población cubana. Rev haban cienc méd [Internet]. 2020 [citado]; 19(1):40-47. Disponible en: <http://www.revhabanera.sld.cu/index.php/rhab/article/view/2858>

Recibido: 17 de junio del 2019.

Aprobado: 07 de enero del 2020.

RESUMEN

Introducción: El factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF) es una proteína involucrada en la proliferación y migración celular del endotelio

vascular, en cuyo gen se ha reportado el polimorfismo +405G>C. Se reconoce que no existen reportes genéticos poblacionales de esta



variante en Cuba, que permitan caracterizar los perfiles inmunogenéticos a nivel molecular, para su aplicación en estudios de asociación alélica.

Objetivo: Describir las frecuencias génicas y genotípicas del polimorfismo VEGF (+405 G>C) en la población cubana.

Material y 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 pesquijaje 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 los cálculos de las frecuencias génicas y genotípicas.

Resultados: La población no se ajustó al modelo de equilibrio de Hardy Weinberg para el gen evaluado. Las frecuencias génicas estimadas para el polimorfismo VEGF (+405 G>C) fueron de 0,33 para el alelo G y de 0,67 para el alelo C. El cálculo de las frecuencias genotípicas resultó en 0,14, 0,37 y 0,49, para las variantes GG, GC y CC, respectivamente.

Conclusiones: Las frecuencias alélicas VEGF.C fueron superiores a la del alelo VEGF.G, siendo el genotipo VEGF.GG el de menor representación en el conjunto estudiado.

Palabras claves: Factor de crecimiento endotelial vascular, Genética de población, Frecuencia alélica.

ABSTRACT

Introduction: The vascular endothelial growth factor (VEGF) is a protein involved in the proliferation and cell migration of the vascular endothelium. In its gene, +405G>C Polymorphism has been reported. There are no population genetic reports of this variant in Cuba that allow the characterization of immunogenetic profiles at a molecular level for its application to allelic association studies.

Objectives: To describe the genic and genotypic frequencies of the VEGF (+405 G>C) polymorphism in the Cuban population.

Material and Methods: A descriptive cross-sectional observational study was carried out from October 2017 to March 2018 in 162 Cuban healthy newborns of both sexes for the neonatal screening for metabolic diseases, whose

biological samples were conserved in the DNA bank of the National Center for Medical Genetics. The molecular characterization of the genotypes was carried out using a PCR-ARMS. The GENEPOP 4.4 software and the statistical software package STATISTICA 8.0 were used for the analysis of genic and genotypic frequencies.

Results: The population did not adjust to the Hardy-Weinberg equilibrium model for the gene evaluated. The estimated gene frequencies of VEGF +405 G> C polymorphism were 0.33 for the G allele and 0.67 for the C allele. The calculation of the genotypic frequencies resulted in 0.14, 0.37 and 0.49, for the variants GG, GC and CC, respectively.

Conclusions: The allelic frequencies of VEGF.C were higher than the frequencies of the VEGF.G



allele, being the VEGF GG the least represented genotype in the group studied.

INTRODUCCIÓN

El factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF) pertenece a la familia de factores de crecimiento PDGF/VEGF (*platelet-derived growth factor / Vascular endothelial growth factor*). Esta proteína es reconocida por los receptores VEGFR1 (*Vascular endothelial growth factor receptor 1*) y VEGFR2 (*Vascular endothelial growth factor receptor 2*) localizados en la superficie de las células endoteliales, así como por el heparán sulfato y la heparina. Estructuralmente presenta 232 aminoácidos y una masa molecular de 27,042 kDa. Está involucrada en la inducción de la proliferación y migración de células del endotelio vascular, es esencial para la angiogénesis, inhibe la apoptosis e induce la permeabilización de vasos sanguíneos.⁽¹⁾

El gen VEGF se encuentra ubicado en el locus 6p21.1, contiene ocho exones y presenta una extensión de 2 770 Kb. La variabilidad de productos génicos de VEGF está dada por el proceso de empalme o *splicing* alternativo que “sufré” el transcrito primario. La gran familia del VEGF está dada por siete factores denominados: VEGF-A, VEGF-B, VEGF-C, VEGF-D, VEGF-E, factor de crecimiento placentario, y VEGF-F.^(2,3)

Los factores genéticos pueden ser determinantes en los niveles de VEGF, y varios polimorfismos del gen se han correlacionado con variaciones en la producción proteica. Entre los Polimorfismos de Simple Nucleótido (SNPs), reportados en la región 5' no traducida del gen y relacionado con

Keywords: Vascular Endothelial Growth Factor, Population Genetics, Gene Frequency.

el proceso de expresión génica, se encuentra VEGF (+405 G>C) (rs2010963).⁽¹⁾

Modificaciones en la regulación de la expresión de VEGF están implicadas en varias situaciones, donde el proceso de angiogénesis es crítico, tales como progresión del cáncer, artritis reumatoidea, complicaciones microvasculares de diabetes mellitus tipo 1 y psoriasis.^(4,5,6,7,8)

En el campo reproductivo, se ha reportado el papel del polimorfismo +405G>C del gen VEGF, como un SNP candidato asociado con la patogénesis de pre-eclampsia, endometriosis, pérdida recurrente del embarazo y síndrome de hiperestimulación ovárica.^(9,10,11,12)

Numerosas investigaciones han intentado establecer asociaciones entre la susceptibilidad, resistencia y/o severidad de ciertas enfermedades y la presencia del polimorfismo +405G>C del VEGF, asumiendo el alelo G como factor de riesgo; sin embargo, los resultados han sido variables en diferentes grupos poblacionales del mundo.⁽²⁾

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 VEGF (+405 G>C) 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.



El **objetivo** de esta investigación es describir las frecuencias génicas y genotípicas del

polimorfismo VEGF (+405 G>C) en la población cubana.

MATERIAL Y 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 VEGF (+405 G>C).

Población y muestra

La población de estudio estuvo constituida por el total de recién nacidos vivos en el periodo de noviembre a diciembre de 2017, a los que se les realizó el tamizaje neonatal entre el quinto y décimo días 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.⁽¹³⁾ El ADN extraído fue analizado cualitativamente en un gel de agarosa a 1% y posteriormente refrigerado a 4° C hasta su utilización.

Para caracterizar molecularmente al polimorfismo VEGF (+405 G>C) se estandarizó un PCR alelo específico (PCR ARMS: amplificación refractaria de mutaciones específicas). El diseño de los cebadores fue tomado según lo reportado por Boudjenah y otros:⁽¹⁴⁾

- F1: 5'-CTCACTTTGCCCTGTCTG-3'
- F2: 5'-CTCACTTTGCCCTGTCC-3'
- R: 5'-GAGGCGCAGCGTTAG-3'

Se amplificó una secuencia de 351 pares de bases en un PCR de 25 ciclos (1º desnaturalización a 95° C por 15 min; 2º desnaturalización a 94° C por 45 s; 3º 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 a 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 for Windows / Linux / Mac OsX (2015) que implementa diferentes métodos tradicionales de análisis de genética poblacional, así como el paquete estadístico STATISTICA 8.0 for Windows (2007) para el análisis de datos. Se determinaron las frecuencias génicas y genotípicas del polimorfismo VEGF (+405 G>C). Estos datos

fueron comparados con los reportados en otras investigaciones al aplicar el test exacto de Fisher. A los valores de la frecuencia esperada se les aplicó la corrección de Levene.⁽¹⁵⁾ 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 menor a 0,05 fue considerado como estadísticamente significativo.

RESULTADOS

En la Figura 1 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 VEGF (+405G>C) en cada individuo de la población de estudio.

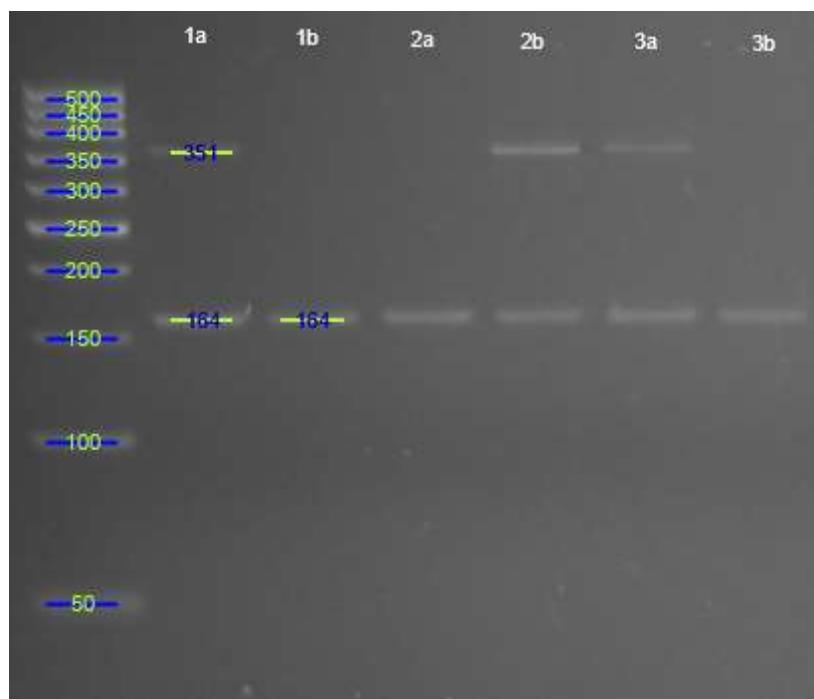


Figura 1. Fotografía de la electroforesis de ADN en geles de agarosa. En el primer carril se evidencia el Patrón de Peso Molecular de 50pb. Cada dos carriles consecutivos se analiza un caso. El primer y segundo carril de cada muestra, identifica el alelo mutado y el alelo salvaje, respectivamente. La banda de 164 pb representa el control interno de amplificación y la banda de 351 pb representa el gen de interés. Caso 1 y 3: Individuos homocigótico para el alelo G; Caso 2: Individuo homocigótico para el alelo C.

En la Tabla 1, se presentan las frecuencias genotípicas del polimorfismo VEGF (+405G>C).

Tabla 1. Distribución de individuos según el genotipo del polimorfismo VEGF (+405G>C)

Genotipo	Frecuencias observadas	Frecuencias genotípicas observadas	Frecuencias esperadas ^[a]	Frecuencias genotípicas esperadas
GG	23	0,14	17,23	0,11
GC	60	0,37	71,54	0,44
CC	79	0,49	73,23	0,45

^[a]: Corrección de Levene.

Las frecuencias génicas estimadas para el polimorfismo VEGF (+405G>C) fueron de 0,33 para el alelo G y 0,67 para el alelo C.

Al calcular el equilibrio de HW se obtuvo que el valor de p para el polimorfismo VEGF (+405G>C) fue igual a 0,04. Este valor ($p < 0,05$) determinó el rechazo de la hipótesis nula, y se asumió que la población 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 igual a 0,03, que justificaron 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 reportado por *Marcheco* y otros,⁽¹⁶⁾ la determinación del origen étnico es importante para el desarrollo de los estudios genéticos poblacionales en Cuba, donde existe un origen ancestral muy heterogéneo.

Las frecuencias alélicas del polimorfismo VEGF (+405G>C), pusieron en evidencia que el alelo C era el más frecuente, lo que concuerda con lo reportado internacionalmente en la *dbSNP Short Genetic Variations*.⁽¹⁷⁾

En un estudio global de 92 individuos no

relacionados, realizado por el Centro de Estudio de Polimorfismos Humanos (*Centre d'Etude du Polymorphisme Human*), donde se incluyeron franceses, norteamericanos y venezolanos, se obtuvo una frecuencia génica de 0,80 y 0,20 para los alelos C y G, respectivamente, sin evidencia de diferencias estadísticamente significativas con el presente estudio. La frecuencia de heterocigóticos se comportó muy similar a la presentada en este informe, con $0,32 \pm 0,05$.⁽¹⁸⁾

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, y permitir que la población alcance el equilibrio en un momento determinado. El resultado relacionado con que el gen evaluado no se ajusta a la Ley de HW, puede ser un indicador de que el locus

CONCLUSIONES

La caracterización de los perfiles inmunogenéticos a nivel molecular en la población estudiada permitió conocer que el alelo C y el genotipo CC para el polimorfismo VEGF (+405G>C) presentan mayor frecuencia en

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.⁽¹⁹⁾

la población estudiada, mientras que el comportamiento de las frecuencias génicas de VEGF.G y frecuencias genotípicas de los individuos VEGF.GG, lo definen como un alelo de baja prevalencia en la población.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Weizmann Institute of Science. GeneCards. Human Gene Database. [Base de datos en internet]. 2019 [Citado 20/05/2019]. Disponible en: <http://www.genecards.org/cgi-bin/carddisp.pl?gene=VEGFA&keywords=VEGF>
2. Online Mendelian Inheritance in Man. Vascular Endothelial Growth Factor. [Internet]. 2019. [Citado 20/05/2019]. Disponible en: <https://www.omim.org/entry/192240>
3. Karaman S, Leppänen VM, Alitalo K. Vascular endothelial growth factor signaling in development and disease. *Development*. [Internet]. 2018 [Citado 20/05/2019]; 145(14):dev151019. Disponible en: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/30030240>
4. Hamedian A, Esteghamati A, Noshad M, MoinTavakkoli H, Nakhjavani M, *et al.* Vascular endothelial growth factor (VEGF) +405 C/G polymorphism is associated with essential hypertension in a population from Tehran of Iran. *Mol Biol Rep*. 2012 May; 39(5):6213-8.
5. Rezaei M, Hashemi M, Sanaei S, Mashhadi MA, Taheri M. Association Between Vascular Endothelial Growth Factor Gene Polymorphisms with Breast Cancer Risk in an Iranian Population. *Breast Cancer* (Auckl). 2016;10:85–91.
6. Paradowska-Gorycka A, Pawlik A, Romanowska-Prochnicka K. Relationship between VEGF Gene Polymorphisms and Serum VEGF Protein Levels in Patients with Rheumatoid Arthritis. *PLoS One*. 2016;11(8):e0160769.
7. Hajiluiian G, Abbasalizad Farhangi M, Jahangiry L. Mediterranean dietary pattern and VEGF +405 G/C gene polymorphisms in patients with metabolic syndrome: An aspect of gene-nutrient interaction. *PLoS One*. 2017;12(2): e0171637.
8. Zablotna M, Sobjanek M, Nedoszytko B, Lange M, Kozicka D, Glen J, *et al.* Association of psoriasis with the VEGF gene polymorphism in the northern Polish population. *J Eur Acad Dermatol Venereol* [Internet]. 2013 [Citado 20/05/2019];102(6): 319-23. Disponible en: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22176586>
9. Banyasz I, Szabo S, Bokodi G, Vannay A, Vasarhelyi B, Szabo A, *et al.* Genetic polymorphisms of vascular endothelial growth factor in severe pre-eclampsia. *Mol Hum Reprod*. 2006;(12): 233-6.
10. Perini JA, Cardoso JV, Berardo PT. Role of vascular endothelial growth factor polymorphisms (-2578C>A,



-460 T>C, -1154G>A, +405G>C and +936C>T) in endometriosis: a case-control study with Brazilians. *BMC Womens Health*. 2014;14:117.

11. Eller A, Branch D, Nelson L, Porter T, Silver R. Vascular endothelial growth factor-A gene polymorphisms in women with recurrent pregnancy loss. *J Reprod Immunol*. 2011;(88):48-52.

12. Ghasemi N, Dehghani Firouzabadi R, Ahmadi S. Association of -460C/T and +405 G/C polymorphisms of vascular endothelial growth factor gene and susceptibility to ovarian hyperstimulation syndrome. *Int J Reprod Biomed (Yazd)*. 2017;15(2):87-92.

13. Protocolo Normalizado de Operaciones de extracción de ADN. La Habana: Centro Nacional de Genética Médica y Biología Molecular; 2017.

14. Boudjenah R, Molina-Gomes D, Torre A, Bergere M, Bailly M, Boitrelle F, *et al*. Genetic Polymorphisms Influence the Ovarian Response to rFSH Stimulation in Patients Undergoing In Vitro Fertilization Programs with ICSI. *PlosOne*. [Internet]. 2012 [Citado 20/05/2019];7(6):e38700. Disponible en: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22701696>

15. Levene H. On a matching problem arising in genetics. *Annals of Mathematical Statistics*. 1949;20: 91-94.

16. Marcheco-Teruel B, Parra E, Fuentes-Smith E, Salas 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.

17. dbSNP Short Genetic Variations. [Base de datos en internet]. 2018 [Citado 25/07/ 2018]. Disponible en: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/snp/rs2010963>

18. dbSNP Short Genetic Variations. [Base de datos en internet]. 2018 [Citado 25/07/ 2018]. Disponible en: https://www.ncbi.nlm.nih.gov/projects/SNP/snp_viewTable.cgi?pop=1303

19. Lardoyt Ferrer R. Ley de Hardy Weinberg. En: Lardoyt 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: 20-30.

Conflicto de intereses

Los autores declaran no tener ningún conflicto de intereses.

Contribución de autoría

Todos los autores participamos en la discusión de los resultados y hemos leído, revisado y aprobado el texto final del artículo.

