

INSTITUTO SUPERIOR DE CIENCIAS MÉDICAS
“DR. SERAFÍN RUIZ DE ZÁRATE RUIZ”
SANTA CLARA, VILLA CLARA

ESTUDIO GENÉTICO CUALITATIVO DEL SISTEMA POLIMÓRFICO DE
HAPTOGLOBINA EN LA REGIÓN CENTRAL DEL PAÍS.

Por:

Dra. Manuela Herrera Martínez¹ y Lic. Isis Noelia Muñiz Bernal²

1. Especialista de II Grado en Genética Médica. Profesora Auxiliar de Genética. ISCM-VC.
2. Licenciada en Ciencias Biológicas. Unidad de Investigaciones Biomédicas. Grupo Biología Molecular. ISCM-VC.

Resumen

La haptoglobina presenta interés genético, bioquímico y clínico. Su estudio en diferentes regiones del mundo muestra un marcado polimorfismo genético. En el trabajo se realiza un estudio cualitativo para ampliar la caracterización genética de la población de la región central del país. Se realizó electroforesis en gel de almidón a 1809 individuos de la provincia de Villa Clara, de los cuales 847 eran adultos donantes de sangre, y a 962 niños ingresados en el Hospital Pediátrico Provincial “José Luis Miranda”. La distribución fenotípica encontrada para cada subpoblación, según el equilibrio Hardy-Weinberg, fue realizada teniendo en cuenta la raza, donde se analiza la frecuencia del gen Hp¹. Se efectuó un análisis de flujo génico y mezcla racial, que mostró un alto grado de mestizaje poblacional. La distribución de los fenotipos, en la muestra de adultos y de niños negroides, demostró equilibrio poblacional; no así en los niños blancos, lo que puede reflejar efectos asociados fenotipo-enfermedad. El gen Hp¹ fue más frecuente en negroides.

Descriptor DeCS:

POLIMORFISMO (GENETICA)
FENOTIPO
GENETICA MEDICA

Subject headings:

POLIMORPHISM (GENETICS)
PHENOTYPE
GENETICS, MEDICAL

Introducción

La haptoglobina (Hp) es una proteína del plasma que muestra polimorfismo genético y tiene diferentes funciones, entre las que se destaca su actividad antioxidante y antimicrobiana. Se ha planteado que su más clara propiedad es la habilidad de combinarse con la hemoglobina y, de esta forma, prevenir la pérdida de hierro en episodios que cursan con hemólisis. Su síntesis no solo ocurre en el hígado, sino también en el tejido adiposo y pulmones. Sus niveles plasmáticos varían en determinados estados patológicos¹.

Para la haptoglobina se han descrito tres patrones fenotípicos con diferentes movilidades electroforéticas en el suero, denominados tipos: 1-1, 2-1, 2-2², que se corresponden con la existencia de dos alelos autosómicos situados en un locus del cromosoma 16, que por hibridación “in situ” se ha demostrado que están en 16q 22 : Hp¹ y Hp². La haptoglobina es una proteína tetramérica, cuyo peso molecular está en dependencia del fenotipo³.

Poseer un fenotipo particular ha sido asociado con algunas enfermedades comunes, como: afecciones cardiovasculares, desórdenes autoinmunes, tumores, con la evolución clínica de los pacientes infectados con el VIH y, al parecer, poseer un fenotipo en particular ofrece cierta protección contra determinadas enfermedades^{1,2,4-7}.

En todas las poblaciones humanas se han encontrado tres tipos principales, con diferentes frecuencias, lo que permite el análisis de la dinámica poblacional de este sistema. Se han descrito numerosas variantes raras con frecuencia inferior al 1 %, debidas, sobre todo, a la heterogeneidad isoeléctrica de la cadena β . Las evidencias demuestran que la Hp es un sistema genético polimórfico. Los polimorfismos humanos son frecuentes, y se plantea que aproximadamente al menos el 30 % de los loci estructurales son polimórficos, es decir, que existen al menos dos alelos, cada uno con frecuencias superiores al 1 %, lo que no podría mantenerse solamente por mutación⁸. A nivel del ADN, los polimorfismos se han mostrado particularmente valiosos en los estudios de clonación posicional, que han permitido el aislamiento de genes causantes de enfermedades, y son de utilidad en los estudios de huella genética, utilizados en el diagnóstico preclínico, prenatal y de detección de portadores de enfermedades, debidas a un gen único. El valor de un sistema polimórfico se calcula hallando su contenido de información polimórfica⁹.

El estudio de los polimorfismos genéticos tiene cierta urgencia, pues con el decursar de los años pocas poblaciones humanas, debido al aumento de las comunicaciones y las relaciones sociales entre los pueblos, conservarán las frecuencias originales de los genes. Por ello, al estudiar los marcadores genéticos en esta región central del país, pretendemos ampliar la caracterización genética de nuestra población y contribuir al análisis de la estructura y dinámica de la población cubana.

Métodos

Se estudió un total de 1809 individuos distribuidos de la forma siguiente: 847 adultos donantes de sangre del Banco Provincial de Santa Clara y 962 niños del Hospital Pediátrico "José Luis Miranda", de la propia ciudad.

Todos los sujetos estudiados fueron clasificados en tres grupos raciales: blancos, mulatos y negros, según criterios subjetivos del clasificador. Se tuvieron en cuenta indicadores morfológicos. La muestra de sangre total se tomó en el Banco Provincial de Sangre y en el Laboratorio Clínico del Hospital Pediátrico, según el caso.

El método empleado para la clasificación de los fenotipos fue la electroforesis horizontal en gel de almidón, descrita por Smithies en 1955, y el sistema de solución amortiguadora de Poulik, 1957. Las muestras fueron preparadas mezclando una gota de un hemolizado de hemoglobina A (200-300 mg/ml) y cinco gotas de plasma. Se utilizó una microtécnica, con placa pequeña de 75 ml de capacidad y 45 minutos de corrida electroforética. El revelado se realizó empleando la tinción de bencidina.

Los fenotipos electroforéticos considerados fueron:

Hp 1-1: Homocigoto para el alelo Hp¹.

Hp 2-1: Heterocigoto para los alelos Hp¹ y Hp².

Hp 2-2: Homocigoto para el alelo Hp².

Hp 2- 1mod: Heterocigoto para los alelos Hp² y Hp^{1M}.

Hp 0-0: Homocigoto para el alelo silente Hp⁰. No se aprecian bandas.

En la figura se muestra un diagrama, con la clasificación empleada para los fenotipos electroforéticos más comunes.

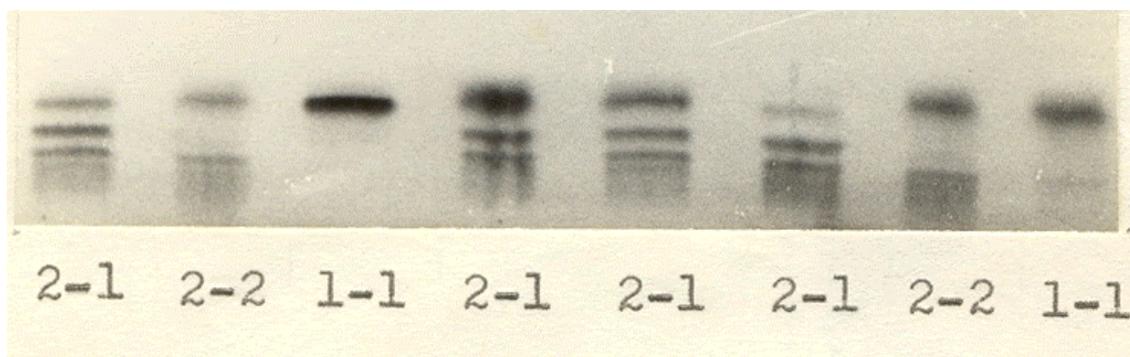


Figura: Diagrama que muestra la clasificación de los fenotipos electroforéticos.

El equilibrio génico se evaluó de forma habitual sobre la base del cumplimiento de la ley de Hardy-Weinberg, y se utilizó su postulado matemático para las frecuencias esperadas de los fenotipos de las poblaciones en estudio: $p^2 + 2pq + q^2$, para Hp 1-1, 2-1 y 2-2, respectivamente. Las frecuencias génicas de Hp^1 y Hp^2 se calcularon por las fórmulas habituales para los casos de ausencia de dominancia^{8,9}.

Para verificar el estado del equilibrio génico, las frecuencias fenotípicas esperadas, según la ley, se compararon con las observadas mediante la prueba de Chi cuadrado de asociación. Para el análisis del flujo génico y la mezcla racial, se utilizó la ecuación de Bernstein, con algunas modificaciones⁶.

Resultados

De los 962 niños estudiados, fueron clasificados como Hp 2-1, el 57,7 %, 1-1 el 20,2 % y 2-2 el 19,8 %. El 2,3 % fue Hp 0-0 y no se encontró la variante 2-1 M (tabla 1).

Tabla 1 Distribución de fenotipos por razas en niños.

Raza	n %	Fenotipos de Hp.					Total
		1-1	2-1	2-2	2-1 M	0-0	
Negros	No.	8	14	7	0	0	29
	%	27,6	48,3	24,1	0	0	3,01
Mulatos	No.	33	79	24	0	2	138
	%	24	57,2	17,4	0	1,4	14,34
Negroides	No.	41	93	31	0	2	167
	%	24,5	55,7	18,6	0	1,2	17,36
Blancos	No.	154	463	160	0	18	795
	%	19,4	58,2	20,1	0	2,3	82,64
TOTAL	No.	195	556	191	0	20	962
	%	20,2	57,7	19,8	0	2,3	100

Fuente: Resultados del estudio electroforético.

En la tabla 2 aparece la distribución esperada de los fenotipos, según la ley de Hardy-Weinberg, para las diferentes razas.

Tabla 2 Equilibrio de Hardy-Weinberg para la distribución de fenotipos por razas en niños.

Raza		Fenotipos de Hp.			p	q	χ^2
		1-1	2-1	2-2			
Negros	OBS	8	14	7	0,517	0,483	0,03723
	ESP	7,75	14,79	6,68			
Mulatos	OBS	33	79	24	0,533	0,467	3,0932
	ESP	38,6	67,75	29,05			
Negroides	OBS	41	93	31	0,530	0,470	2,8515
	ESP	46,35	82,20	36,45			
Blancos	OBS	154	463	160	0,496	0,504	28,6960
	ESP	191,37	388,34	197,28			

Fuente: Resultados del estudio electroforético.

En los niños, la distribución del gen Hp¹ (p) fue de 0,53 en mulatos, 0,51 en negros y 0,49 en blancos.

Las distribuciones de los fenotipos observadas concuerdan con las esperadas, según el equilibrio de Hardy-Weinberg para la raza negra, mulata y para los negroides, en general ($p < 0,05$). La discrepancia entre las frecuencias observadas y esperadas, para los distintos fenotipos en los niños blancos, fue altamente significativa ($p > 0,01$).

En la muestra, de 847 adultos analizados (tabla 3) aparecieron los cinco fenotipos electroforéticos. Se clasificaron como 2-1, el 50,1 % de la muestra, 23 % como 1-1 y 23,3 % fueron 2-2; 2-1M el 3%, y el 0,6 % como Hp 0-0. Los fenotipos 2-1 M y 0-0 fueron encontrados, fundamentalmente, en negroides, y los fenotipos 1-1 alcanzaron 27,2 % de los negroides, mientras se encontraron en el 20 % de los europoides analizados.

Tabla 3 Distribución de fenotipos por razas en adultos.

Raza	n	Fenotipos de Hp.					TOTAL
		1-1	2-1	2-2	2-1 M	0-0	
Negros	No.	49	72	34	14	2	171
	%	28,9	42,1	19,9	8,2	1,2	20,19
Mulatos	No.	48	89	40	8	1	186
	%	25,8	47,85	21,51	4,3	0,54	21,96
Negroides	No.	97	161	74	22	3	357
	%	27,2	45,1	20,7	6,2	0,8	42,15
Blancos	No.	98	264	124	4	0	490
	%	20	53,9	25,3	0,8	0	57,85
TOTAL	No.	195	425	198	26	3	847
	%	23	50,1	23,3	3	0,6	100

Fuente: Resultados del estudio electroforético

Las frecuencias génicas de Hp¹ y Hp² encontradas en la población adulta y la distribución esperada de los fenotipos analizados por razas, así como el cumplimiento del equilibrio de Hardy-Weinberg para todos los grupos raciales considerados, aparecen en la tabla 4. Las frecuencias de los fenotipos observados en las distintas razas concuerdan con las esperadas en todos los casos ($p < 0,05$).

Tabla 4 Equilibrio de Hardy-Weinberg para la distribución de fenotipos por razas en adultos.

Raza		Fenotipos de Hp.			p	q	χ^2
		1-1	2-1	2-2			
Negros	OBS	49	72	34	0,548	0,452	0,6008
	ESP	46,55	79,79	31,66			
Mulatos	OBS	48	89	40	0,523	0,477	0,0071
	ESP	48,42	88,323	40,28			
Negroides	OBS	97	161	74	0,535	0,465	0,213
	ESP	95,05	165,19	71,81			
Blancos	OBS	98	264	124	0,473	0,527	3,78
	ESP	108,73	242,29	134,91			

Fuente: Resultados del estudio electroforético

OBS: Observado

ESP: Esperado

Se investigaron los valores obtenidos para el análisis del flujo génico y la mezcla racial; m es el flujo de genes de la población básica a la híbrida, y 1-m es el por ciento de genes originales africanos que quedan en la población híbrida.

Se encontró que el flujo génico por generación fue de 6,46 % de genes que fluyen de la población básica a la híbrida en cada generación, y 55,13 % de genes blancos están presentes en la población negroide en su conjunto, donde persisten 44,86 % de genes originarios africanos, respecto a este marcador.

Discusión

La población cubana actual está formada por blancos (descendientes de españoles), negros (descendientes de africanos) y mulatos (mezcla racial de negros y blancos), que van siendo cada vez un elemento más numeroso dentro de nuestra población. Es por eso que, al analizar la distribución por fenotipos de cualquier marcador genético en el momento actual, se impone hacerlo en nuestro país por grupos raciales, ya que las frecuencias génicas varían para los diferentes grupos.

Puede observarse cómo la frecuencia en los blancos del gen Hp^1 es superior a la de los blancos españoles, lo que podría ser indicativo de mezcla racial; asimismo, la de Hp^1 de los negros es más baja que la de los negros africanos, y esto podría tener la misma explicación. La frecuencia de este alelo en la población mulata no ocupa, en los niños, como era de esperar, un lugar intermedio entre las frecuencias de negros y blancos, por lo que se supone que no existe un modelo de dilución simple para este marcador. Es un fenómeno que ha sido descrito por otros autores, en relación con las características de los polimorfismos sobre los cuales actúan fuerzas selectivas⁸.

El gen Hp^1 fue más observado en negroides que en blancos. La diferencia entre las frecuencias de p (Hp^1) y q (Hp^2), entre los niños negros y mulatos, no son marcadas.

Con relación a la distribución fenotípica, la mayor frecuencia de Hp 1-1 es en los grupos negroides, y el por ciento de individuos con Hp 2-2 en los blancos es mayor que en los negroides en general, lo que concuerda con la distribución de los genes referida anteriormente. La causa de esta desigual distribución entre los grupos raciales se desconoce.

La frecuencia del fenotipo 2-1, en la muestra de niños, excede ligeramente el esperado del 50 %, según la ley de Hardy-Weinberg; este exceso de heterocigotos también se ha encontrado en otros estudios. En la distribución del alelo Hp se destaca el exceso de heterocigotos que ya ha sido hecha para polimorfismos que no están en equilibrio, y se ha explicado por efectos de selección.

La distribución de los fenotipos para la raza mulata, negra y negroide en general, según la ley de Hardy-Weinberg, muestra concordancia y, por tanto, puede inferirse que están en equilibrio y que no hay factores selectivos que actúen sobre el locus del gen Hp. El hecho de que la distribución de los fenotipos para la raza blanca, no muestre concordancia entre los valores esperados y observados para la ley del equilibrio poblacional, debiera interpretarse como la existencia de algún o algunos factores que estén actuando sobre este gen. Una posible explicación es el hecho de que

la muestra de niños es hospitalaria, donde se supone, se estudiaron niños con diferentes enfermedades y se ha considerado la posible asociación entre algunos fenotipos de Hp y estados, como el asma bronquial, la diabetes y las leucosis².

Para este subgrupo, en el fenotipo 2-1 se observa un exceso de lo observado sobre lo esperado, que es el más significativo.

En la muestra analizada de adultos sanos, donantes de sangre, no se encontró el exceso de heterocigotos presente en los niños y la proporción de los mismos está de acuerdo con lo esperado por la ley de Hardy-Weinberg, si bien hubo un discreto aumento entre los descendientes de europoides. Igual correspondencia entre lo observado y lo esperado, hallado para los demás fenotipos en todas las razas, permite suponer la ausencia de factores selectivos y la existencia de una población en equilibrio génico.

La frecuencia del gen Hp¹, en negroides adultos es mayor que entre los blancos, lo que se observó también en los niños y en otros estudios realizados, y soporta igual análisis^{3,10}, pues la frecuencia del gen Hp¹ es más alta entre los descendientes de africanos que en los de europoides. En esta muestra, la frecuencia del alelo Hp¹ en el grupo considerado mulato, constituye un modelo de dilución simple claramente explicado por mestizaje racial, que no fue encontrado en la muestra de niños. Aquí el alelo Hp¹ en nuestros "mulatos", al resultar con una frecuencia intermedia entre la de los europoides y los negroides, cumple el modelo de dilución simple descrito para genes en equilibrio poblacional.

En general, la mayor frecuencia de los fenotipos 1-1, 2-1 M y 0-0 entre los individuos negroides, concuerda con la bibliografía consultada, para lo cual –como en la base de otros polimorfismos–, se considera que existen factores selectivos de mucha importancia en el pasado, en el presente o en ambos, que motivan las diferencias entre las frecuencias génicas de distintos grupos raciales^{6,8,9}.

En nuestro país podemos considerar como población básica la blanca, por ser más numerosa, según los censos realizados en los últimos años; así, en el estudio de flujo génico, el paso de genes blancos a la población mulata es mayor que a la población negra, y tiene un valor intermedio cuando se considera la población negroide en general. Esta investigación se realizó para la muestra de adultos que cumplió el equilibrio Hardy-Weinberg en todas las razas.

Por este marcador genético podemos plantear que el grado de mezcla racial de la población cubana es alto. Es bueno señalar, que aunque se ha realizado el análisis de flujo génico en una sola dirección, y se ha considerado como población básica la blanca, de la cual fluyen genes a la población negroide, se puede plantear que el flujo de genes es bidireccional, pues se produce tanto la entrada de genes blancos a la población negroide, como la de genes negroides a la población blanca.

En general, se aportaron evidencias a la caracterización genética de la población de la provincia, donde:

- EL cumplimiento del equilibrio poblacional para los fenotipos de la proteína plasmática haptoglobina, en todos los adultos y los niños negroides en general, supone la no existencia de factores selectivos que actúen sobre dicho gen.
- El no cumplimiento de la ley de Hardy-Weinberg en niños europoides sugiere buscar asociación entre fenotipos de Hp y enfermedades frecuentes en la infancia.
- El grado de mestizaje de la población estudiada es alto, y las frecuencias intermedias del alelo Hp¹ en mulatos, con respecto a las frecuencias en blancos y negros, permiten hablar de dilución simple por mezcla racial, excepto en la muestra de niños blancos, lo que es una nueva evidencia de la necesidad de estudiar su posible asociación con enfermedades pediátricas.

Summary

Haptoglobin presents a genetic, biochemical, and clinical interest. Its study in several parts of the world shows a marked genetic polymorphism. In this work, a qualitative study is carried out in order to improve the population genetic characterization in the central region of the country. Starch gel

electrophoresis was performed in 1809 subjects in Villa Clara province, out of which 847 were adult blood donors and 962 were children admitted in the Provincial Pediatric Hospital "José Luis Miranda". The phenotypic distribution found for each sub-population according to the equilibrium Hardy-Weinberg was accomplished taking into account the race in which frequency of the gene type Hp is analyzed. A genetic flow and racial mixture analysis was carried out and it showed a high degree of population miscegenation. The phenotype distribution in the Negroid adult and children sample showed a population balance, but this was not the case in white children. This can suggest illness-phenotype associated effects. Hp1 gene was found more frequently in negroids.

Referencias bibliográficas

1. Matuszek MA, Aristoteli LP, Bannon PG, Hendel PN, Hughes CF, Jessup W, Dean RT, Kritharides L. Haptoglobin elutes from human atherosclerotic coronary arteries--a potential marker of arterial pathology. *Atherosclerosis*. 2003;168(2):389-96.
2. Wassell J. Haptoglobin: function and polymorphism. *Clin Lab*. 2000;46(11-12):547-52.
3. Isolation of acute phase proteins from plasma for determination of fractional synthesis rates by stable isotope tracer technique. *Anal Biochem*. 1996;236(1):95-100.
4. De Bacquer D, De Backer G, Langlois M, Delanghe J, Kesteloot H, Kornitzer M. Haptoglobin polymorphism as a risk factor for coronary heart disease mortality. *Atherosclerosis*. 2001;157(1):161-6.
5. Quaye I, Ekuban F, Brandful J, Gyan BA, Akanmori BD. Haptoglobin polymorphism in human immunodeficiency virus infection: HpO phenotype limit depletions of CD4 cells counts in HIV-1 seropositive individuals. *J Infect Dis*. 2000;181(4):1483-5.
6. Funmei Yang, Andrew J, Damon C, Frank J, Christi A, Coalson J. Pulmonary expression of the human haptoglobin gene. *Am J Respir*. 2000;23(3):277-82.
7. Langlois MR, Delanghe JR. Biological and clinical significance of haptoglobin polymorphism in humans. *Clinical Chemistry*. 1996;42:1589-600.
8. Vogel F. *Human genetics: problems and approaches*. Berlín: Springer; 1997.
9. Mueller R, Young ID. *Principios y prácticas de Genética Médica*. En: Emery AEH. *Genética Médica*. 10a ed. Madrid: Marbán ; 2001. p. 358 -62.