



Carta científica

Polimorfismos en el gen *FRMD4A* se asocian a riesgo de enfermedad pulmonar obstructiva crónica en población latinoamericana

Polymorphisms in the *FRMD4A* Gene Are Associated With Chronic Obstructive Pulmonary Disease Susceptibility in a Latin American Population

Al Director:

El estudio PLATINO estimó que el 16,9% de la población de Santiago de Chile con edad igual o superior a 40 años padece EPOC¹, y resultados preliminares de nuestro estudio MaulEPOC mostraron que el 90% de los pacientes con EPOC de la región chilena del Maule eran fumadores o exfumadores². Una de las causas del alto impacto de la EPOC en Chile podría ser la elevada prevalencia de tabaquismo en la población³.

Más allá del déficit de alfa-1-antitripsina, se han descrito múltiples variantes genéticas asociadas a la enfermedad, incluyendo *CHRNA3/5*⁴, región también asociada con la adicción a la nicotina. Así, otros genes relacionados con el hábito tabáquico podrían tener también un papel relevante en la patogénesis de la EPOC⁵. En este sentido se han descrito algunos polimorfismos de nucleótido único (SNP) pertenecientes al gen *FRMD4A* significativamente asociados con dependencia a la nicotina en asiáticos⁶. Algunos de estos SNP fueron replicados también en poblaciones caucásicas y afroamericanas. Sin embargo, hasta la fecha no existe ningún estudio que haya analizado el gen *FRMD4A* en sujetos con y sin EPOC de origen latinoamericano. En consecuencia, el objetivo del presente trabajo fue analizar la contribución de SNP localizados en el gen *FRMD4A* en la susceptibilidad a EPOC en población chilena.

Se reclutaron un total de 568 sujetos (322 con EPOC y 246 controles sanos) en el Hospital Regional de Talca entre 2016 y 2018. Todos firmaron un consentimiento informado aprobado por el Comité de Ética del Servicio de Salud del Maule. El diagnóstico de EPOC se confirmó de acuerdo a los criterios de la GOLD⁷ y los pacientes EPOC clínicamente estables y los controles sanos se sometieron a pruebas funcionales. También se les tomó una muestra de sangre para los análisis moleculares y contestaron un cuestionario estandarizado² sobre antecedentes sociales y demográficos, tratamiento actual, comorbilidades, índice CAT, grado de disnea según la escala modificada del *Medical Research Council*, número de exacerbaciones en los últimos 2 años y en cuántas de ellas se requirió hospitalización. Además, se registraron antecedentes de exposición a factores de riesgo de EPOC conocidos, como el historial tabáquico (índice paquetes-año) y exposición intradomiciliaria a humo de biomasa. Esta investigación cumple con las pautas para estudios en humanos y se llevó a cabo éticamente de acuerdo con la Declaración de la Asociación Médica Mundial de Helsinki.

Del total de la cohorte, 214 pacientes con EPOC y 193 controles sanos fueron genotipificados. Se escogieron 60 SNP marcadores de haplotipo (ht-SNP) basados en patrones de desequilibrio de ligamiento (LD) ubicados dentro del gen *FRMD4A*, utilizando el conjunto de datos HapMap⁸. Los SNP marcadores de haplotipo se seleccionaron con la herramienta Tagger de Haploview⁹, de acuerdo al siguiente criterio: frecuencia del alelo menor $\geq 0,01$ y $r^2 > 0,8$ y basándonos en las poblaciones HapMap (CEU = población de referencia europea y MEX = población de referencia nativa mexicana). Se genotipificó mediante la plataforma OpenArray[®]™ *TaqMan* (Applied Biosystems Inc., California, EE. UU.).

La variable sexo se expresó en número de sujetos y las diferencias entre grupos de estudio se determinaron con la prueba Chi-cuadrado. Las variables continuas fueron expresadas con la media y la desviación estándar. Para estas últimas se realizó un análisis de la varianza ANOVA, tomando como significativo un p valor $< 0,05$. Estos análisis se llevaron a cabo con el paquete estadístico R (R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria). Las frecuencias alélicas entre pacientes EPOC y controles sanos se compararon mediante la prueba de Chi-cuadrado, y las razones de momios (*odds ratio*) con intervalos de confianza del 95% se calcularon usando el programa PLINK¹⁰.

Se observaron diferencias significativas en las proporciones de sexos entre los sujetos control y los pacientes EPOC ($p < 0,05$), aunque la edad fue similar en ambos grupos ($p > 0,05$; *tabla 1*). Los pacientes EPOC mostraron valores reducidos de VEF₁, VEF₁/CVF, DL_{CO} y saturación de oxígeno, así como un menor desempeño en la prueba de caminata ($p < 0,05$; *tabla 1*). Además, los pacientes EPOC presentaron mayores exposiciones acumuladas al tabaco y al humo de biomasa ($p < 0,05$; *tabla 1*).

Los SNP seleccionados cumplieron con una frecuencia de alelo menor $> 0,01$, genotipificado exitoso en al menos el 90% de las muestras y equilibrio panmítico, $p > 0,005$, por lo que todos fueron incluidos en el estudio de asociación. Para la comparación de las frecuencias de los diferentes marcadores SNP analizados, la corrección de Bonferroni se realizó multiplicando el valor de p por el número de SNP analizados en el estudio ($n = 60$) para obtener el valor de p corregido (p Bonferroni). Los valores de p inferiores a 0,05 se consideraron significativos. Siete marcadores mostraron tendencia a asociarse con la susceptibilidad a padecer EPOC ($p < 0,05$), siendo 2 de ellos (rs10906545 y rs1218353) los que presentaron mayor asociación (p Bonferroni $< 0,05$) (*tabla 2* [todos los sujetos]). Cuando se analizaron únicamente los individuos fumadores, tanto controles como EPOC, rs10906545 y rs1534627 se asociaron significativamente con la susceptibilidad a EPOC (*tabla 2* [solo en fumadores]). Dado que la intensidad del hábito tabáquico medida en paquetes/año fue significativamente mayor en pacientes EPOC fumadores que en controles fumadores ($36,77 \pm 16,22$ versus $14,25 \pm 9,63$, respectivamente, $p < 0,05$), la asociación podría estar más ligada a la

Tabla 1
Datos clínicos y epidemiológicos

	Controles n = 193	EPOC n = 214
Sexo, H/M, N (%)	60 (31)/133 (69)	121 (57)/93 (43)*
Edad, años	68,66 ± 3,25	70,97 ± 4,69
Historial tabáquico, paquetes/año	7,75 ± 3,25	30,47 ± 14,82*
Hábito tabáquico, n (%)		
Fumadores	31 (16)	29 (13)
Exfumadores	63 (33)	136 (64)
Nunca fumadores	99 (51)	49 (23)
Exposición a biomasa, horas/año	96,87 ± 32,57	225,62 ± 54,28*
Escolarización, años completados	14,33 ± 2,57	7,21 ± 3,98*
IMC, kg/m ²	29,45 ± 5,02	26,96 ± 5,02*
Exacerbaciones en el año anterior	--	1,37 ± 1,50
VEF ₁ , % del predicho	108,84 ± 18,40	61,47 ± 24,56*
VEF ₁ /CVF, %	83,00 ± 6,27	58,25 ± 10,48*
DLCO, % del predicho	87,43 ± 24,48	72,33 ± 25,13*
Saturación de oxígeno, %	96,14 ± 2,34	92,36 ± 4,76*
C6M, metros	462,95 ± 87,82	351,50 ± 155,61*
mMRC	--	2,28 ± 1,39
CAT	--	14,94 ± 8,46
BODE	--	3,18 ± 2,74

Datos mostrados como media ± desviación estándar, excepto cuando se indique lo contrario.

BODE: *Body-mass, airflow obstruction, dyspnea and exercise*; CAT: Test de calidad de vida (*COPD Assessment Test*); C6M: test de caminata en 6 minutos; CVF: capacidad vital forzada; DLCO: capacidad de difusión del monóxido de carbono; IMC: índice de masa corporal; mMRC: escala de disnea modificada del *Medical Research Council*; VEF₁: volumen espiratorio forzado en el primer segundo.

* Indica una diferencia significativa respecto a los controles (p < 0,05).

Tabla 2
Variantes asociadas significativamente con la susceptibilidad a padecer EPOC en toda la cohorte analizada (todos los sujetos) y solo en fumadores

Todos los sujetos									
SNP	Posición	Odds ratio	IC 95%	Valor de p	p Bonferroni	A1	MAF casos	MAF controles	
rs10906545	13978235	1,97	1,47-2,62	3,97 × 10 ⁻⁶	2,38 × 10 ⁻⁴	A	0,54	0,37	
rs1218353	14318441	2,41	1,54-3,77	7,82 × 10 ⁻⁵	4,69 × 10 ⁻³	G	0,18	0,08	
Solo fumadores*									
SNP	Posición	Odds ratio	IC 95%	Valor de p	p Bonferroni	A1	MAF casos	MAF controles	
rs10906545	13978235	2,30	1,59-3,33	8,87 × 10 ⁻⁶	5,32 × 10 ⁻⁴	A	0,55	0,35	
rs1534627	13969539	2,11	1,46-3,06	6,77 × 10 ⁻⁵	4,06 × 10 ⁻³	T	0,48	0,31	

A1: alelo de menor frecuencia; IC 95%: intervalo de confianza al 95% (*confidence interval*); MAF: frecuencia del alelo de menor frecuencia (*minor allele frequency*); SNP: polimorfismo de nucleótido único (*single nucleotide polymorphism*).

* 165 casos y 94 controles.

dependencia de nicotina (y, por tanto, a la dosis acumulada de tabaco) que a los mecanismos intrínsecos de la enfermedad frente a sus desencadenantes. Por el contrario, cuando se analizaron únicamente los pacientes y controles sin historial tabáquico no hubo asociación (datos no mostrados).

Nuestros resultados muestran por primera vez que los SNP rs10906545, rs1218353 y rs1343005 se asocian a mayor riesgo de desarrollar EPOC en población fumadora. A pesar de que el polimorfismo rs4424567 del gen *FRMD4A* había sido previamente asociado con dependencia a la nicotina en un estudio presentado por Yoon et al.⁶, este no mostró ninguna asociación en nuestra cohorte, ni tampoco se ubica próximo a los SNP que sí resultaron significativamente asociados a la EPOC. Además, el SNP rs1534627 solo se asoció con EPOC al considerar a los sujetos fumadores, y la asociación se perdió al incluir a los sujetos no fumadores, probablemente a consecuencia de un efecto estadístico en que los individuos no fumadores contrarrestaron las diferencias observadas en los fumadores.

El gen *FRMD4A* codifica para una proteína de andamiaje que activa al factor de ribosilación del ADP 6 (Arf6)¹¹, implicado en la transducción de señales celulares, tráfico de membrana y organización del citoesqueleto¹². La sobreexpresión genética de *FRMD4A* se ha asociado a carcinoma de células escamosas de cabeza y cuello, así como a carcinoma de pulmón no microcítico^{13,14}. Además, se ha

reportado la hipermetilación de *FRMD4A* en células MCF-7 tratadas con benzopireno¹⁵, un hidrocarburo aromático policíclico presente en muchos contaminantes ambientales, como el humo de biomasa, y también en el humo del cigarrillo¹⁶. En el caso de la EPOC se ha descrito que existen variaciones en el patrón de metilación del ADN entre pacientes con EPOC o con una reducción en la función pulmonar y sujetos control^{17,18}. En este sentido, un estudio reciente de Morrow et al. puso de manifiesto la existencia de diferencias en la metilación del gen *FRMD4A* entre sujetos con y sin EPOC¹⁹. Además, también se ha reportado que *FRMD4A* está asociado con dependencia a la nicotina¹⁴ y se ha demostrado recientemente que fumar durante el embarazo provoca cambios en el patrón de metilación del gen *FRMD4A* en los recién nacidos, y que dichos cambios persistían durante muchos años tras la exposición prenatal²⁰.

En conclusión, el presente estudio es el primero en describir una asociación entre polimorfismos del gen *FRMD4A* y riesgo de desarrollar EPOC. En conjunto, nuestros resultados y los de estos estudios previos sugieren que variaciones tanto genéticas como epigenéticas en el gen *FRMD4A* podrían estar implicadas en la patogenia de la EPOC. Dado que *FRMD4A* también se asocia a dependencia a la nicotina, nuestros resultados subrayan la necesidad de desarrollar nuevas estrategias para el tabaquismo y la EPOC.

Financiación

El presente estudio ha sido financiado por la Agencia Nacional de Investigación y Desarrollo de Chile (ANID, Fondecyt #11150022). El Dr. Jordi Olloquequi está financiado por un contrato Serra Húnter de la Generalitat de Catalunya (UB-LE-9035). El Dr. Roberto Díaz-Peña está financiado por un contrato Miguel Servet del ISCIII (CP21/00003).

Agradecimientos

Los autores agradecen a los participantes del estudio su disposición a contribuir en la investigación médica, a la Srta. Cintia Muñoz y a la Srta. Hanuxa Celedón por el apoyo técnico prestado en la investigación. También agradecen al Dr. Robert J.A. Halford su aporte intelectual durante la gestión del proyecto MaulEPOC.

Bibliografía

- Menezes AM, Perez-Padilla R, Hallal PC, Jardim JR, Muino A, Lopez MV, et al. Worldwide burden of COPD in high- and low-income countries. Part II. Burden of chronic obstructive lung disease in Latin America: The PLATINO study. *Int J Tuberc Lung Dis*. 2008;12:709–12.
- Ollolquequi GJ, Jaime JS, Parra RV, Muñoz VC, Muñoz GA, Lastra FF, et al. Caracterización general de los pacientes con EPOC de la Región del Maule: resultados preliminares del estudio MaulEPOC. *Revista Chilena de enfermedades respiratorias*. 2017;33:284–92.
- (OPS) OPdS. Informe sobre el control del tabaco en la Región de las Américas 2018. 2018.
- Ragland MF, Benway CJ, Lutz SM, Bowler RP, Hecker J, Hokanson JE, et al. Genetic advances in COPD: Insights from COPDGene. *Am J Respir Crit Care Med*. 2019.
- Ishii T, Hagiwara K. Genetic Predisposition to COPD: Are There Any Relevant Genes Determining the Susceptibility to Smoking? En: Nakamura H, Aoshiba K, editores. *Chronic Obstructive Pulmonary Disease. Respiratory Disease Series: Diagnostic Tools and Disease Managements*. Singapore: Springer; 2017. https://doi.org/10.1007/978-981-10-0839-9_3
- Yoon D, Kim YJ, Cui WY, Van der Vaart A, Cho YS, Lee JY, et al. Large-scale genome-wide association study of Asian population reveals genetic factors in FRMD4A and other loci influencing smoking initiation and nicotine dependence. *Hum Genet*. 2012;131:1009–21.
- GOLD. Global Strategy for diagnosis, management, and prevention of COPD–2016. 2016.
- Frazer KA, Ballinger DG, Cox DR, Hinds DA, Stuve LL, Gibbs RA, et al. A second generation human haplotype map of over 3.1 million SNPs. *Nature*. 2007;449:851–61.
- Barrett JC, Fry B, Maller J, Daly MJ. Haploview: Analysis and visualization of LD and haplotype maps. *Bioinformatics*. 2005;21:263–5.
- Purcell S, Neale B, Todd-Brown K, Thomas L, Ferreira MA, Bender D, et al. PLINK: A tool set for whole-genome association and population-based linkage analyses. *Am J Hum Genet*. 2007;81:559–75.
- Ikenouchi J, Umeda M. FRMD4A regulates epithelial polarity by connecting Arf6 activation with the PAR complex. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2010;107:748–53.
- Donaldson JG. Multiple roles for Arf6: Sorting, structuring, and signaling at the plasma membrane. *J Biol Chem*. 2003;278:41573–6.
- Goldie SJ, Mulder KW, Tan DW, Lyons SK, Sims AH, Watt FM. FRMD4A upregulation in human squamous cell carcinoma promotes tumor growth and metastasis and is associated with poor prognosis. *Cancer Res*. 2012;72:3424–36.
- Velcheti V, Thawani R, Khunger M, Mukhopadhyay S, Chute DJ, Schrock AB, et al. FRMD4A/RET: A Novel RET oncogenic fusion variant in non-small cell lung carcinoma. *J Thorac Oncol*. 2017;12:e15–6.
- Sadikovic B, Andrews J, Rodenhiser DI. DNA methylation analysis using CpG microarrays is impaired in benzopyrene exposed cells. *Toxicol Appl Pharmacol*. 2007;225:300–9.
- Silva R, Oyarzun M, Olloquequi J. Pathogenic mechanisms in chronic obstructive pulmonary disease due to biomass smoke exposure. *Arch Bronconeumol*. 2015;51:285–92.
- Qiu W, Baccarelli A, Carey VJ, Boutaoui N, Bacherman H, Klanderman B, et al. Variable DNA methylation is associated with chronic obstructive pulmonary disease and lung function. *Am J Respir Crit Care Med*. 2012;185:373–81.
- Machin M, Amaral AF, Wielscher M, Rezwan FI, Imboden M, Jarvelin MR, et al. Systematic review of lung function and COPD with peripheral blood DNA methylation in population based studies. *BMC Pulm Med*. 2017;17:54.
- Morrow JD, Cho MH, Hersh CP, Pinto-Plata V, Celli B, Marchetti N, et al. DNA methylation profiling in human lung tissue identifies genes associated with COPD. *Epigenetics*. 2016;11:730–9.
- Richmond RC, Suderman M, Langdon R, Relton CL, Davey Smith G. DNA methylation as a marker for prenatal smoke exposure in adults. *Int J Epidemiol*. 2018;47:1120–30.

Roberto Díaz-Peña^{a,b}, Raül F. Julià^c, Juan F. Montes^d, Rafael S. Silva^e y Jordi Olloquequi^{f,b,*}

^a *Fundación Pública Galega de Medicina Xenómica, SERGAS; Grupo de Medicina Xenómica-USC, Instituto de Investigación Sanitaria de Santiago (IDIS), Santiago de Compostela, España*

^b *Laboratorio de Patología Celular y Molecular; Instituto de Ciencias Biomédicas, Facultad de Ciencias de la Salud, Universidad Autónoma de Chile, Talca, Chile*

^c *EDP Salut Sant Joan de Reus-Baix Camp; CAP La Selva del Camp, Tarragona, España*

^d *Departament de Biologia Cel·lular, Fisiologia i Immunologia; Facultat de Biologia, Universitat de Barcelona, Barcelona, España*

^e *Unidad Respiratorio, Centro de Diagnóstico Terapéutico, Hospital Regional de Talca, Talca, Chile*

^f *Departament de Bioquímica i Fisiologia, Facultat de Farmàcia i Ciències de l'Alimentació, Universitat de Barcelona, Barcelona, España*

Autor para correspondencia.

Correo electrónico: jordiolloquequi@ub.edu (J. Olloquequi).