

# Polimorfismos de un solo nucleótido en el gen IGFLR asociados con el peso bajo al nacimiento y el crecimiento postnatal temprano

Mónica Liliana Durán Picón (1), Dra. María Luisa Lazo de la Vega Monroy (2)

<sup>1</sup> Lic. Químico Farmacéutico Biólogo, Universidad de Guanajuato | Dirección de correo electrónico: ml.duranpicon@ugto.mx

<sup>2</sup> Departamento de Ciencias Médicas, División de Ciencias de la Salud, Campus León, Universidad de Guanajuato | Dirección de correo electrónico: marialuisaafb@yahoo.com.mx

## Resumen

**Introducción:** La recuperación del crecimiento en los primeros meses de vida es deseable en niños con peso bajo al nacimiento pero se ha relacionado con adiposidad, resistencia a la insulina y enfermedades cardiovasculares. **Objetivo:** Estandarizar técnicas de extracción de ADN por raspado bucal, PCR y digestión de ADN con enzimas de restricción, para analizar la presencia de SNPs en el gen IGF1R en infantes nacidos de peso adecuado y bajo para la edad, y evaluar su asociación con el peso al nacimiento y el crecimiento postnatal en población de Guanajuato. **Materiales y métodos:** Se seleccionaron 30 pacientes de 5 a 13 meses de edad productos de embarazos sanos. Se genotipificó la presencia o ausencia del polimorfismo y se asoció con el peso bajo al nacimiento. **Resultados y discusión:** No se encontraron diferencias significativas de los genotipos entre los pacientes ( $p > 0.05$ ), pero se observó una tendencia de peso bajo al nacimiento cuando los pacientes presentan el polimorfismo y su crecimiento postnatal temprano no se ve favorecido. **Conclusiones:** La Menor Frecuencia Alélica (MAF) reportada para México concuerda con la población estudiada del Bajío. La presencia del polimorfismo se ve afectada en el peso bajo al nacimiento y el crecimiento postnatal.

## Abstract

**Introduction:** The recovery of growth in the first months of life is desirable in children with low birth weight but has been associated with adiposity, insulin resistance and cardiovascular diseases. **Objective:** To standardize techniques for extracting DNA cheek swab, PCR and DNA digestion with restriction enzymes to analyze the presence of SNPs in the IGF1R gene in infants born to healthy weight and underweight, and assess its association with the birth weight and postnatal growth per year of age population of Guanajuato. **Materials and Methods:** 30 patients were selected from 5 to 13 months old, products healthy pregnancies. The presence or absence of the polymorphism was genotyped and was associated with low birth weight. **Results and discussion:** There are not significant differences of genotypes found among patients ( $p > 0.05$ ), but a trend of low birth weight was observed in patients with polymorphism and early postnatal growth is not favored. **Conclusions:** Minor allele frequency (MAF) reported for Mexico agrees with the study population in the Bajío. The presence of the polymorphism is affected by low birth weight and postnatal growth.

## Palabras Clave

rs4966035; SNP; ADN; Peso bajo al nacimiento; Guanajuato.

## INTRODUCCIÓN

### Single Nucleotide Polymorphism (SNP)

SNP se define como una sola sustitución de nucleótido por otro nucleótido (transición o transversión) [1]. La mayoría de los SNPs se encuentran en el ADN como intrones o secuencias intergénicas no codificantes [2]. Puede que aparezcan uno cada 1000 pb [1].

Los SNPs pueden ser responsables de la diversidad entre los individuos, la evolución del genoma, los rasgos familiares más comunes, como el pelo rizado, las diferencias interindividuales en la respuesta al fármaco, complejos y enfermedades comunes como la diabetes, la obesidad, la hipertensión y los trastornos psiquiátricos. Estos pueden cambiar los aminoácidos codificados o pueden estar en silencio. Ellos pueden influir en la actividad del promotor (la expresión del gen), el ARN mensajero (ARNm) conformación (estabilidad), y la localización subcelular de los ARNm y/o proteínas, entonces pueden producir enfermedades [1].

### IGF1R

El gen IGF1R contiene 21 exones, se extiende sobre 310 kb y se encuentra en el cromosoma 15q25-q26. El gen IGF1R es homólogo al gen del receptor de insulina con respecto a su organización en el exón y el intrón, y es más que 50% idéntica. Ambas proteínas precursoras de codificación se someten a modificaciones post traduccionales para dar lugar a los receptores que se componen de dos subunidades  $\alpha$ - y dos  $\beta$ -, conectadas por enlaces disulfuro para formar un complejo heterotetramérico  $\alpha_2\beta_2$  de diseño generalmente similar [2].

#### Importancia de polimorfismos en IGF1R

La duplicación de un gen ancestral durante la evolución de vertebrados y adquisición de la exón adicional 11 en el receptor de la insulina puede haber dado lugar a la diversificación funcional de IGF1R [4].

Estudios han descrito polimorfismos en IGF1R con resultados en el síndrome de ovario poliquístico, el cáncer de mama, la longevidad, la esquizofrenia [2] densidad mineral ósea, pubarquia prematura, y el riesgo de bacteriemia en la anemia de células falciformes [4] pero poco se ha visto sobre el crecimiento postnatal en población mexicana.

El gen IGF1R participa de manera importante en mecanismos genéticos asociados al peso al nacimiento y la ganancia de peso durante la etapa postnatal temprana. Sin embargo, la identificación de SNPs relacionados a estas condiciones es escasa, y está limitada a estudios en población europea. En el presente proyecto, se propone analizar el gen *IGF1R* para identificar si el SNP rs4966035 responsable del cambio de A por G, y si se asocia con el peso bajo al nacimiento y el crecimiento postnatal temprano en población mestiza de la región centro de México.

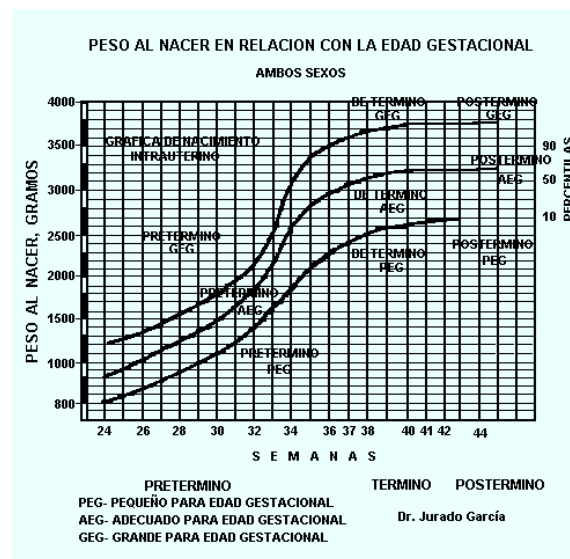


IMAGEN 1: Percentiles de peso al nacer en relación con la edad gestacional [3].

Cada año nacen más de 20 millones de niños con un peso inferior a 2500 g, el 96% de ellos en países en desarrollo. Estos lactantes con bajo peso al nacer corren un mayor riesgo de morbilidad neonatal [5].

La recuperación del crecimiento en los primeros meses de vida está presente en niños nacidos pequeños y es altamente deseable, ya que elimina el déficit de crecimiento. Sin embargo, este crecimiento se ha relacionado con un mayor riesgo

de adiposidad, resistencia a la insulina y las enfermedades cardiovasculares [6].

La población mexicana posee una tendencia al padecimiento de enfermedades crónicas no transmisibles, por lo que es indispensable la identificación de los factores genéticos contribuyentes. Atenuar esta tendencia es importante porque la obesidad y las enfermedades crónicas no transmisibles repercuten de manera importante en la salud y el desempeño a lo largo del curso de la vida [7].

## MATERIALES Y MÉTODOS

### Selección de muestras y obtención de ADN

El estudio se llevó a cabo de acuerdo a los lineamientos establecidos de forma internacional en la Declaración de Helsinki de la Asociación Médica Mundial. Se incluyeron 30 pacientes mestizos de 5 a 13 meses de edad, con previa firma de la carta de consentimiento informado. Los pacientes fueron captados entre el 30 de junio del 2015 y el 08 de julio del 2015 en la clínica IMSS T21. Se excluyó a los pacientes cuyas madres presentaron enfermedades metabólicas durante el embarazo. Se obtuvieron muestras de raspado bucal. Se depositaron en buffer de lisis TSNT, de las que se extrajo el ADN con proteiase K, fenol saturado, Sevag, TE 1X, etanol puro y etanol al 70%. La pureza del ADN fue evaluada por electroforesis en geles de agarosa al 1%.

### Genotipificación

Se utilizaron 4µL de ADN genómico para la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) en las siguientes condiciones: 2 µL de Buffer 10X para PCR (200 mM Tris-HCl pH 8,4, 500 mM KCl), 0.8 µL de MgCl<sub>2</sub> 50mM, 1 µL de dNTPs 2mM, 0.67 µL de cada oligonucleótido 10pM/µL para el análisis del SNP rs4966035, 0.27 µL de Taq polimerasa Platinum® y 10.59 µL de agua estéril para un volumen final de 20µL. Los oligos fueron diseñados en la plataforma de Primer-Blast [8] con la secuencia Fasta obtenida de la base de datos en NCBI [9]. Se amplificó un segmento de 598 pb el cual contiene un sitio de corte para la enzima de

restricción TaqI (Invitrogen™), en la secuencia 5'-T↓CG A-3'. El programa utilizado en PCR radica en 3 fases: Desnaturalización a 94°C durante 30 seg, alineación a 67°C por 30 seg y extensión a 72°C durante 2 min; esto por 35 ciclos. Se tomaron 7.5 µL de PCR obtenida para digerir con 1 U de la enzima de restricción TaqI en un volumen total de 10 µL, se incubó 60 min a 65°C. Las condiciones de la digestión fueron las siguientes: 0.5 µL de TaqI, 1 µL de Buffer 10X TaqI (0.1 M Tris-HCl pH 8.3, 1 M NaCl, 50mM MgCl<sub>2</sub>, 0.1% BSA), 1 µL de 0.1% BSA. Se evaluó la existencia de amplificación por electroforesis en geles de agarosa al 2% y la digestión por electroforesis en geles de agarosa al 3%. Si existe la digestión, se obtienen fragmentos de 439 y 158 pb. Se toma como un indicador de que existe el SNP si hay digestión de lo contrario, el paciente no presenta el SNP.

## RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Los pacientes capturados en el servicio de EMI de la clínica IMSS T21, fueron en promedio de 9.14 meses de edad. Del total de los pacientes 50% son varones y 50% féminas; producto de embarazos de madres de 27.3 años de edad en promedio. La población de pacientes estudiada es perteneciente a Guanajuato.

Se ha reportado que en población Americana descendientes de mexicanos, la menor frecuencia alélica (MAF) pertenece al alelo ancestral (A) con un índice de 0.45 [9]. De acuerdo a la población estudiada, como se observa en la Tabla 1, efectivamente tenemos una MAF para A.

Tabla 1: Frecuencias alélicas calculadas por el equilibrio de Hardy Weinberg [10].

Alelos	A/A	A/G	G/G
1. No. observados	2	7	5
2. Frec. HW esperado	2.16	6.68	5.16
3. Porcentaje	15.43	47.7	36.86
Frecuencias de alelos: A = 11 (39.29%); G = 17 (60.71%)			

Se observó que los pacientes con mayor peso promedio y dentro del percentil 90, presentan el alelo A, lo que los cataloga con peso adecuado [3]. En cambio, los pacientes que presentan el alelo variante (G), tienen una tendencia menor de peso, aunque siguen dentro de la clasificación de peso adecuado [3]. Ver Tabla 2.

Tabla 2: Resumen de promedios de peso al nacimiento y su desviación estándar según los genotipos observados.

Genotipos	A/A	A/G	G/G
1. Promedio de peso al nacimiento (Kg)	3.65	3.05	3.18
2. Desviación estándar	0.07	0.54	0.28

Se realizó un análisis de varianza (ANOVA) y se obtuvo que no hay diferencia significativa entre los genotipos ( $p > 0.05$ ).

Se realizó un análisis para observar el crecimiento de los pacientes [11] y se observó que en relación al peso y a una edad de 6 – 7 meses, los pacientes con el alelo A, muestran un crecimiento apropiado (según la base de datos de la OMS [11]) mientras que los pacientes con el alelo G, no muestran el crecimiento deseado. Este mismo comportamiento se observó al relacionar peso con talla así como talla con la edad ya mencionada. Sin embargo, cuando se relacionó el IMC con la edad de 6 – 7 meses, los pacientes con el alelo variante muestran un aumento del IMC en comparación con los pacientes con el alelo ancestral A. Ver Tabla 3.

Tabla 3: Resumen de crecimiento postnatal a los 6 – 7 meses de edad de los genotipos observados en la población estudiada basados en la desviación estándar del peso normal reportados por la OMS [11].

Genotipos	A/A	A/G	G/G
1. Peso/Talla	$-0.72 \pm 0.39$	$-0.8 \pm 2.98$	$-1.23 \pm 2.39$
2. Peso/Edad	$0.58 \pm 0.88$	$-0.67 \pm 1.27$	$-0.57 \pm 1.59$
3. Talla/Edad	$1.25 \pm 0.74$	$-0.62 \pm 0.57$	$-1.01 \pm 2.69$
4. IMC/Edad	$-0.13 \pm 0.52$	$-0.98 \pm 2.42$	$0.18 \pm 3.32$

Se realizó un análisis de varianza (ANOVA) y se obtuvo que no hay diferencia significativa entre los genotipos ( $p > 0.05$ ).

## CONCLUSIONES

La presencia del polimorfismo en el gen IGF1R, muestra que los pacientes tienden a presentar peso bajo al nacimiento y que a la edad de 6 – 7 meses no tienden a mostrar un crecimiento deseable pero si un aumento del índice de Masa Corporal (IMC) en comparación con la población que no presenta el polimorfismo.

## AGRADECIMIENTOS

Agradezco a la Universidad de Guanajuato, mi alma máter, por la oportunidad de completar la formación académica de sus alumnos. Al equipo de laboratorio Dr. Rubén Rangel Salazar, Raquel Sandoval García y Ricardo López González quienes se convirtieron en mis amigos, gracias por dedicarme parte de su tiempo y consejos para la mejora de la investigación. Al Instituto Mexicano de Seguro Social, la Dra. Martha Hernández y la Enf. Emma Reséndiz quienes cedieron la oportunidad de lograr una parte importante del proyecto. A los padres que accedieron a participar en el proyecto, su cooperación refleja una vía de las ganas de mejorar al país.

## REFERENCIAS

- [1] Shastry, B. S. (2009). SNPs: impact on gene function and phenotype. En *Single Nucleotide Polymorphisms*. Humana Press, (578), pp. 3-22. doi: 10.1007/978-1-60327-411-1\_1.
- [2] Ester, W. A., & Hokken-Koelega, A. C. S. (2008). Polymorphisms in the IGF1 and IGF1R genes and children born small for gestational

age: results of large population studies. *Best Practice & Research Clinical Endocrinology & Metabolism*, 22(3), pp. 415-431. doi: 10.1016/j.beem.2008.03.001

[3] Norma Oficial Mexicana NOM-007-SSA2-1993, Atención de la mujer durante el embarazo, parto y puerperio y del recién nacido. Criterios y procedimientos para la prestación del servicio. Recuperado de: <http://www.salud.gob.mx/unidades/cdi/nom/007ssa23.html>.

Consultada 16-Jul-2015.

[4] Klammt, J., Kiess, W., & Pfäffle, R. (2011). IGF1R mutations as cause of SGA. *Best Practice & Research Clinical Endocrinology & Metabolism*, 25(1), pp. 191-206. doi: 10.1016/j.beem.2010.09.012.

[5] Biblioteca electrónica de documentación científica sobre medidas nutricionales (eLENA). (2015). Suiza. Recuperado de [http://www.who.int/elena/titles/supplementary\\_feeding/es/](http://www.who.int/elena/titles/supplementary_feeding/es/).

Consultada 15-Jul-2015.

[6] Jain, V., & Singhal, A. (2012). Catch up growth in low birth weight infants: striking a healthy balance. *Reviews in Endocrine and Metabolic Disorders*, 13(2), pp. 141-147. doi: 10.1007/s11154-012-9216-6.

[7] Gutiérrez J.P., Rivera Dommarco J., Shamah Levy T., Villalpando Hernández S., Franco A., Cuevas Nasu L., Romero Martínez M., Hernández Ávila M. (2012). Encuesta Nacional de Salud y Nutrición 2012. Resultados Nacionales. Cuernavaca, México: Instituto Nacional de Salud Pública (MX), 2012. Recuperado de <http://ensanut.insp.mx/informes/ENSANUT2012ResultadosNacionales.pdf>. Consultada 14-Jul-2015.

[8] The National Center for Biotechnology Information advances science and health by providing access to biomedical and genomic information (2015). Recuperado de [http://www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/primer-blast/index.cgi?LINK\\_LOC=BlastHome](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/primer-blast/index.cgi?LINK_LOC=BlastHome). Consultado 18-Jun-2015.

[9] The National Center for Biotechnology Information advances science and health by providing access to biomedical and genomic information (2015). Recuperado de <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>. Consultado 18-Jun-2015.

[10] Hardy-Weinberg Equilibrium Calculator for 2 Alleles. (2010). © Had2Know 2010 – 2015. Recuperado de <http://www.had2know.com/academics/hardy-weinberg-equilibrium-calculator-2-alleles.html>. Consultada 16-Jul-2015.

[11] WHO ANTRHO (versión 3.2.2) [software]. (2011). Organización Mundial de la Salud. Recuperado de <http://www.who.int/childgrowth/software/es/>. Consultada 08-Jul-2015.