

Variantes Genéticas en IGFBP3 y su Relación con el Peso Bajo al Nacimiento y el Crecimiento Postnatal Temprano

López González Ricardo (1), Lazo de la Vega Monroy Maria Luisa (2)

¹ [Lic. Químico Farmacéutico Biólogo, División de Ciencias Naturales y Exactas] | Dirección de correo electrónico: [rich.log.92@hotmail.com]

² [Departamento de Ciencias Médicas, División de Ciencias de la Salud, Campus León, Universidad de Guanajuato] | Dirección de correo electrónico: [marialuisaqfb@yahoo.com.mx]

Resumen

El Polimorfismo de un solo nucleótido (“Single nucleotide polymorphism” SNP) es la forma más simple de la variación del ADN entre los individuos, estos cambios se producen en todo el genoma a una frecuencia de aproximadamente uno de cada 1000 pb. Los SNPs puede cambiar los aminoácidos codificados, puede ser silenciosos, o simplemente producirse en las regiones no codificantes. El Gen IGF1 codifica una proteína similar a la insulina en función y estructura, este gen es miembro de una familia de proteínas implicadas en la mediación de crecimiento y desarrollo. El Gen IGFBP3 es miembro de la familia de unión a la proteína del factor de crecimiento similar a la insulina (IGFBP). El presente proyecto consta de una extracción de ADN para su posterior genotipificación para el SNP rs2854744 por medio de un análisis con enzimas de restricción. El análisis de las variantes genéticas en el gen IGFBP3 y su relación con el peso bajo al nacimiento y crecimiento postnatal temprano no se pudo realizar, puesto que no se logró obtener la amplificación por medio de una PCR para dicho gen.

Abstract

Single nucleotide polymorphism (SNP) is the simplest form of DNA variation among individuals, these simple changes occur throughout the genome at a frequency of about one in 1,000 bp. SNPs may change the encoded amino acids or can be silent or simply occur in the noncoding regions. IGF1 gene encodes the protein similar to insulin in function and structure and is a member of a family of proteins involved in mediating growth and development. IGFBP3 gene is a member of the insulin-like growth factor binding protein (IGFBP). This work contained DNA extraction for subsequent genotyping for SNPs rs2854744 by a restriction enzyme analysis. The analysis of genetic variants in the IGFBP3 gene and its relation with low birth weight and early postnatal growth can't be performed, because the amplification obtained by PCR is not consistent with the literature.

Palabras Clave

ADN bucal; Integridad de ADN; PCR; SNP; Polimorfismo rs2854744.

INTRODUCCIÓN

Variantes genéticas

El Polimorfismo de un solo nucleótido (“Single nucleotide polymorphism” SNP) es la forma más simple de la variación del ADN entre los individuos. Estos cambios simples pueden ser de transición o transversión, se producen en todo el genoma a una frecuencia de aproximadamente uno de cada 1000 pb. Estos 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. SNPs puede cambiar los aminoácidos codificados, puede ser silenciosos, o simplemente producirse en las regiones no codificantes. Estos pueden influir en la actividad del promotor (la expresión del gen), en la conformación (estabilidad) del ARN mensajero (ARNm), y la localización subcelular de los ARNm y / o proteínas y por lo tanto pueden producir enfermedades. Por lo tanto, la identificación de numerosas variaciones en los genes y el análisis de sus efectos pueden conducir a una mejor comprensión de su impacto en la función de los genes y la salud de un individuo. Este conocimiento mejorado puede proporcionar un punto de partida para el desarrollo de nuevos marcadores de SNP útiles para las pruebas médicas y desarrollo de un medicamento individualizado más seguro para el tratamiento de los devastadores trastornos más comunes. Esto va a revolucionar el campo de la medicina en el futuro.[1]

Gen IGF1

La proteína codificada por este gen es similar a la insulina en función y estructura, este gen es miembro de una familia de proteínas implicadas en la mediación de crecimiento y desarrollo. La proteína codificada se procesa a partir de un precursor, obligado por un receptor específico, y posteriormente secretada. Los defectos en este gen son una causa de la deficiencia de factor de crecimiento similar a la insulina I.[2]

Gen igfbp3

Este gen es miembro de la familia de unión a la proteína del factor de crecimiento similar a la insulina (IGFBP) y codifica una proteína con un dominio de IGFBP y un dominio de tiroglobulina tipo I. La proteína forma un complejo ternario con la subunidad ácido lábil del factor de crecimiento similar a la insulina (IGFALS), también lo hace con el factor de crecimiento similar a la insulina (IGF) I o II. En esta forma circula en el plasma, prolongando la vida media de las IGFs y alterando su interacción con los receptores de la superficie celular.[3]

Antecedents

El gen IGFBP3 se ha estudiado con diferentes enfoques, por ejemplo: se ha asociado el gen IGF1 e IGFBP3 con el riesgo de varios tipos de cáncer, como el de ovarios [4]; la expresión del gen IGF1R en pacientes con cáncer de mama y Diabetes Mellitus Tipo II [5]; la asociación del gen IGF1 e IGFBP3 con Endometriosis [6]; valoración de la eficiencia osteogénica de la conjugación de nano partículas de oro-quitosano conjugadas con IGFBP3 como recubrimiento de implantes dentales [7].

Existen estudios en los que se evaluó la relación de los componentes del crecimiento (incluidos la IGFBP3) con alteraciones del crecimiento fetal y tamaño del recién nacido demostrando la existencia de una relación en la población Chilena de recién nacidos.

Tanto la expresión génica como el contenido proteico de IGF-I, IGFBP-3, ALS e IGF-IR, se encuentran aumentados en las placentas de niños Pequeños para la Edad Gestacional en comparación con las placentas de niños Grandes para la Edad Gestacional.[8]

Las medianas de los factores de crecimiento analizados en RN AEG y GEG duplican los valores de los Recién Nacidos Pequeños para la Edad Gestacional.[9]

Justificación

Con lo anterior mencionado respecto al gen IGF e IGFBP3, y los estudios realizados respecto a la relación de los componentes del crecimiento con alteraciones del crecimiento fetal y tamaño del recién nacido se plantea en el presente proyecto analizar el gen IGFBP3 para identificar si algún SNP (por ejemplo el rs2854744) se asocia con el peso bajo al nacimiento y crecimiento postnatal temprano en la población mestiza de la región centro de México, puesto que las alteraciones de peso al nacimiento y el crecimiento postnatal acelerado constituyen un problema potencial de salud a nivel nacional y mundial, no solamente por su importancia dentro de la sobrevivencia y salud postnatal, sino también, por las complicaciones en la vida adulta del neonato, como enfermedades cardiovasculares y renales, obesidad, síndrome metabólico y diabetes tipo 2.

El presente proyecto consta de una recolección de muestras bucales para la extracción de ADN, el análisis de la integridad del DNA una vez extraído, una PCR para el gen IGFBP3 y una

genotipificación para el SNP rs2854744 por medio de un análisis con enzimas de restricción.

MATERIALES Y MÉTODOS

Reclutamiento de pacientes: los pacientes fueron infantes de 6-13 meses de edad sanos, reclutados en el servicio de EMI (Enfermería Materno Infantil) del HGZ 21 del IMSS de la ciudad de León Gto.

Obtención de ADN bucal: se tomó una muestra de raspado bucal con un Citobrush de los pacientes reclutados y de la madre. Las muestras fueron rotuladas con números consecutivo del 1 al 41 (No. de paciente) seguidos de una letra "M" o "B" (mama o bebe respectivamente). Dicha muestra fue procesada para la extracción de ADN.

Análisis de integridad de ADN: el ADN extraído se analizó por medio de una electroforesis con un gel de agarosa al 1%.

PCR: la PCR fue realizada con los siguientes oligos para el gen IGFBP3:

Fwd: 5´CCACGAGGTACACACGAATG3´

Rvs: 5´AGCCGCAGTGCTCGCATCTGG3´

Y analizada por medio de una electroforesis con un gel de agarosa al 2%.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Reclutamiento de pacientes: se reclutaron 42 pacientes, de los cuales se excluyeron 11 pacientes (2,4,8,14,19,21,22,29,32,36,40) por no cumplir con los criterios de inclusión, 7 pacientes (2,19,21,35,36,37,39) por cuestiones técnicas (mala integridad de ADN o no se logró aislar ADN).

Extracción y análisis de integridad de ADN: las muestras de los pacientes 2,19,21,35,36,37 y 39 mostraron por medio de una electroforesis mala

calidad de ADN o presencia nula, por lo cual fueron excluidos dichos pacientes.

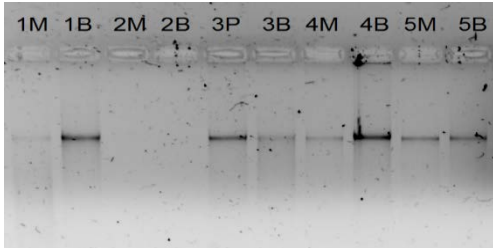


Fig 1.- Electroforesis de ADN extraído (1-5).

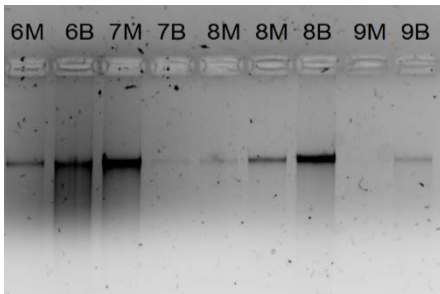


Fig 2.- Electroforesis de ADN extraído (6-9).



Fig 3.- Electroforesis de ADN extraído (10-14).

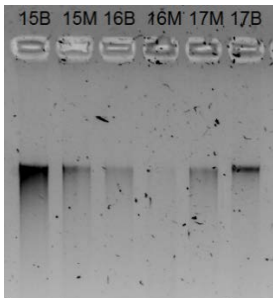


Fig 4.- Electroforesis de ADN extraído (15-17).

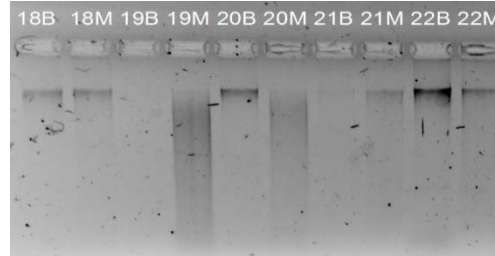


Fig 5.- Electroforesis de ADN extraído (18-22).

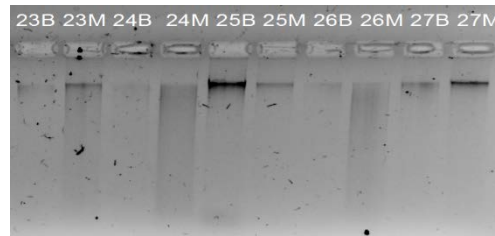


Fig 6.- Electroforesis de ADN extraído (23-27).

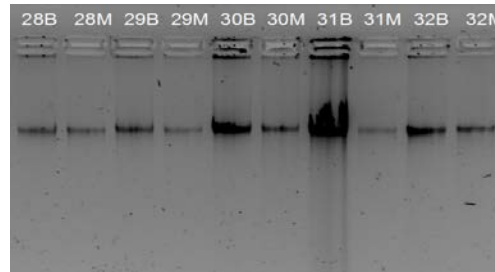


Fig 7.- Electroforesis de ADN extraído (28-32).

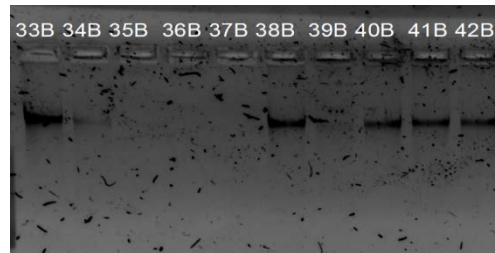


Fig 8.- Electroforesis de ADN extraído (33B-42B).

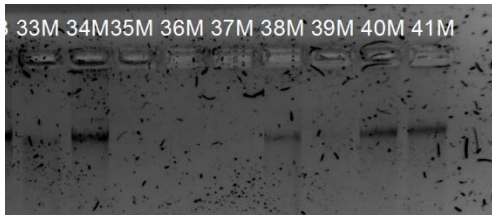


Fig 9.- Electroforesis de ADN extraído (33 M-41M).

PCR: dicha reacción se realizó a diferentes T_m que van de 56-76 °C, dando negativa la amplificación.

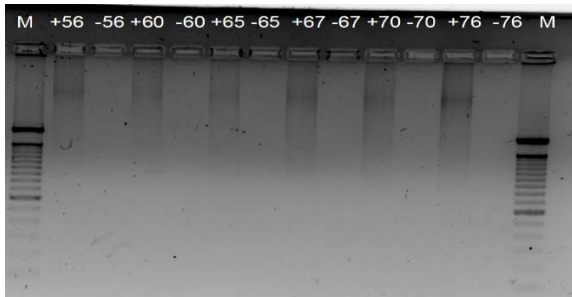


Fig 10.- Electroforesis del producto de PCR.

Se realizó una PCR con una T_m de 63°C con diferentes cantidades de ADN (200,400 y 600 ng). Dando productos inespecíficos para la amplificación deseada.

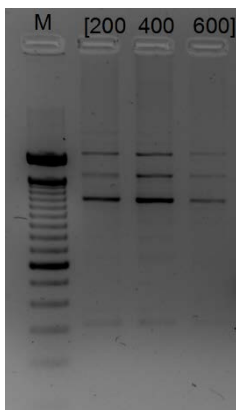


Fig 11.- Electroforesis del producto de PCR.

Se realizó una PCR a una T_m de 58,64 y 68 por duplicado, adicionando DMSO a cada uno de los

duplicados. Obteniendo productos inespecíficos para la amplificación del gen deseado.

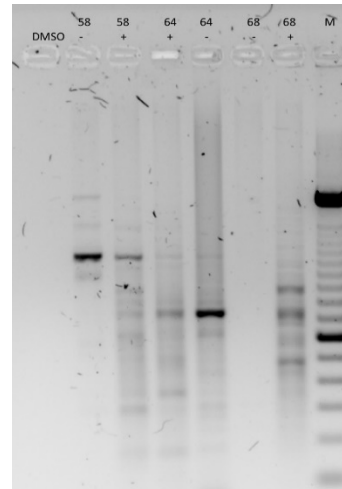


Fig 12.- Electroforesis del producto de PCR.

Se realizó una PCR en Touchdown de 70-64°C. En la cual no se logró ni una amplificación.

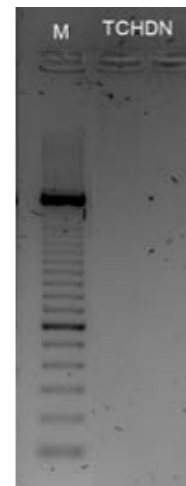


Fig 13.- Electroforesis del producto de PCR.

CONCLUSIONES

El análisis de las variantes genéticas en el gen IGFBP3 y su relación con el peso bajo al nacimiento y crecimiento postnatal temprano no se

puedo realizar, puesto que la amplificación por medio de una PCR para dicho gen y su posterior genotipificación no se logró obtener, los productos obtenidos de las PCR realizadas no concuerdan con lo esperado en la literatura para dicho gen (463 pb [10]).

AGRADECIMIENTOS

Al Programa Institucional de Verano, a la Dra. Maria Luisa Lazo de la Vega Monroy y a la Enfermera Emma que hicieron posible este trabajo de investigación.

Al Dr. Rubén Rangel Salazar por el apoyo y enseñanzas aportadas durante el desarrollo de este trabajo de investigación.

A mis padres (Leticia del Pilar González de López y Jaime López Cardona) y familiares que me apoyaron durante el desarrollo de este trabajo de investigación.

A todas las personas que hicieron posible este trabajo de investigación de manera directa o indirectamente.

REFERENCIAS

[1] Department of Biological Sciences, Oakland University, Rochester, MI, USA.

[2] IGF1 insulin-like growth factor 1 (somatomedin C) [*Homo sapiens* (human)], NCBI, <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/3479>.

[3] IGFBP3 insulin-like growth factor binding protein 3 [*Homo sapiens* (human)], NCBI, <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/3486#general-gene-info>.

[4] Department of Gynecology and Obstetrics, West China Second Hospital, Sichuan University, Chengdu, Sichuan 610041, P.R. China.

[5] Department of Medical Oncology, Cancer Center, The State Key Laboratory of Biotherapy, West China Hospital, Sichuan University, Chengdu, Sichuan, China.

[6] A Prospective Study of Insulin-Like Growth Factor 1, Its Binding Protein 3, and Risk of Endometriosis, NCBI, <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26121987>.

[7] Department of Oral Biochemistry, Institute of Oral Bioscience, School of Dentistry, Chonbuk National University, Jeonju, Republic of Korea.

[8] Rev Esp Endocrinol Pediatr 2012;3 Suppl(1):33-37 | Doi. 10.3266/RevEspEndocrinolPediatr.pre2012.Apr.96, <http://www.endocrinologiapediatrica.org/modules.php?name=articulos&idarticulo=96&idlangart=ES>

[9] Rev Chil Pediatr 2010; 81 (1): 20-27, http://www.scielo.cl/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0370-41062010000100003&lng=en&nrm=iso&ignore=.html

[10] NCBI/ Primer-BLAST, <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/primer-blast/primertool.cgi>.