

POLIMORFISMOS EN EL GEN DE LA GRELINA Y SU RELACIÓN CON EL PESO AL NACIMIENTO

Sandoval García Raquel (1), Lazo de la Vega Monroy María Luisa (2)

1 [Licenciatura en Químico Farmacéutico Biólogo, Universidad de Guanajuato] | Dirección de correo electrónico: [Raquel.sandovalg@gmail.com]

2 [Departamento de Ciencias Médicas, División ciencias de la Salud, Campus León, Universidad de Guanajuato] | Dirección de correo electrónico: [Dirección de correo electrónico]

Resumen

Introducción: En el presente proyecto, se propone analizar SNPs en los genes que codifican para GHRL para identificar si variantes en estos genes están asociados con el peso bajo al nacimiento y el crecimiento postnatal temprano en población mestiza de la región centro de México. **Materiales y métodos:** se obtuvieron muestras de 30 bebés (previo consentimiento informado por parte de la madre), de los cuales 19 fueron del sexo masculino y 11 del sexo femenino, se obtuvo muestra de DNA genómico por raspado bucal, se procesaron mediante la técnica PCR-RFLP para la genotipificación de dos polimorfismos (rs27647 y rs26802), usando enzimas de restricción para los dos polimorfismos (MseI y TseI) y se visualizaron en un gel de agarosa al 3%. **Resultados y discusión:** de acuerdo a los resultados obtenidos para el gen GHRL-1 se observa que la población está en equilibrio mediante el análisis de datos por Hardy Weinberg, y no se encuentran diferencias significativas de este gen relacionadas con el peso al nacimiento. Para el gen GHRL-2 el equilibrio no se ve presente, y tenemos diferencias significativas. **Conclusiones:** aún falta mucho terreno por cubrir para tener un monitoreo de la salud neonatal y la prevención de enfermedades de la vida adulta, pero se espera seguir en este ramo de la investigación.

Abstract

Introduction: In this project, we propose to analyze SNPs in genes encoding GHRL to identify whether variants in these genes are associated with low birth weight and early postnatal growth in mixed population of central Mexico. **Materials and Methods:** Samples of 30 babies were obtained (prior informed consent from the mother), of which 19 were male and 11 female, genomic DNA sample was obtained by cheek swab, they processed using the technique PCR-RFLP genotyping for two polymorphisms (rs27647 and rs26802), using restriction enzymes for the two polymorphisms (MseI and TseI) and visualized on an agarose gel 3%. **Results and discussion:** according to the results obtained for the GHRL - 1 gene shows that the population is in equilibrium by analyzing data from Hardy Weinberg, and no significant differences in this gene related to birth weight are. For GHRL - 2 gene balances is not present, and we have significant differences. **Conclusions:** lack even much ground to cover to have a neonatal health monitoring and prevention of diseases of adulthood, but is expected to continue in this line of research

Palabras Clave

Polimorfismo; PCR-RFLP; Gen; Grelina; DNA genómico.

INTRODUCCIÓN

El bajo peso al nacer (BPN) ha constituido un enigma en la ciencia a través de los tiempos. Múltiples son las investigaciones realizadas acerca de las causas que lo producen y las consecuencias que provoca. Su importancia no solo radica en lo que significa en la morbilidad y la mortalidad infantil, sino que estos niños tienen habitualmente múltiples problemas posteriores. El

Programa para la Reducción del BPN señala que los niños nacidos con un peso inferior a los 2 500 g presentan riesgo de mortalidad 14 veces mayor durante el primer año de vida, en comparación con los niños que nacen con un peso normal a término. [1].

Tanto el crecimiento fetal como postnatal tienen un componente genético importante, y en ellos participan hormonas como la Grelina. La Grelina es un péptido cerebro-intestinal de 28 aminoácidos, actúa como un ligando endógeno para su receptor, el receptor de la hormona del crecimiento secretagoga, para ejercer una variedad de funciones que van desde la estimulación de secreción de la hormona del crecimiento, regulación del apetito y el metabolismo energético, y la protección celular para modulación de la inflamación [2]. Algunos polimorfismos en el gen de grelina (GHRL) se han asociado a obesidad de inicio temprano, así como a diabetes tipo 2. Sin embargo, no se conocen aún variantes genéticas en GHRL asociadas a crecimiento fetal. Por ello, es necesario evaluar la contribución genética de la grelina en el crecimiento fetal y postnatal en la población mexicana.

En algunos estudios se han reportado que los niveles de grelina en infantes con bajo peso al nacer son más alto comparado con los infantes de peso normal y peso alto en el periodo neonatal temprano y el tercer mes de vida. Estos descubrimientos indican que la grelina toma parte en el balance de energía y ésta afecta desde el desarrollo nutricional intrauterino [3].

En el presente proyecto, se propone analizar SNPs en los genes que codifican para GHRL para identificar si variantes en estos genes están asociados con el peso bajo al nacimiento y el crecimiento postnatal temprano en población mestiza de la región centro de México.

Los resultados obtenidos en este proyecto contribuirán al conocimiento actual del papel de los factores genéticos en el establecimiento del peso al nacimiento y el crecimiento postnatal, esto podrá ayudar en un futuro a establecer posibles puntos de monitoreo e intervención terapéutica para la salud neonatal y la prevención de enfermedades metabólicas en la vida adulta.

MATERIALES Y MÉTODOS

Sujetos:

Los sujetos fueron reclutados del departamento de enfermería materno infantil (EMI), del Instituto Mexicano del Seguro Social (IMSS T-21) de la ciudad de León Guanajuato.

Se obtuvieron muestras de 30 bebés (previo consentimiento informado por parte de la madre), de los cuales 19 fueron del sexo masculino y 11 del sexo femenino. Los sujetos fueron seleccionados, basándonos en los siguientes criterios:

Criterios de inclusión: infantes sanos de 1 año de edad, con información de datos somatométricos al nacimiento completa, nacidos a término (37 a 40 semanas), con peso bajo (por debajo de la percentila 10) y adecuado (entre la percentila 10 y la 90) para la edad gestacional cuyas madres estuvieran sanas y no tuvieran complicaciones (enfermedad hipertensiva en el embarazo, síndrome de anticuerpos antifosfolípido, sin enfermedades del tejido conectivo, enfermedades infecciosas crónicas, tabaquismo o alcoholismo durante el embarazo) al momento del embarazo o parto.

Criterios de exclusión: infantes con enfermedades crónicas o endocrinas, deficiencia de hormona de crecimiento, anomalías genéticas o cromosómicas, características o síndromes dimórficos, enfermedades psiquiátricas o neurodegenerativas en ellos o en los padres, infantes adoptados o falta de consentimiento informado por parte de la madre.

Criterios de no inclusión: no se incluirán en el estudio aquellos individuos cuyos datos se encuentren incompletos o cuya muestra no logre ser genotipificada por cuestiones técnicas (degradación del DNA).

Selección de SNPs y genotipificación

El gen grelina se extiende por 5 kb del ADN genómico en el cromosoma 3p25-26, que consta de cuatro intrones y cinco exones, incluyendo un exón no codificante 1.

La región de regulación 5'upstream del gen grelina consta de sitios de varios factores de transcripción tales como el factor estimulador upstream -1 / -2 , activador Proten - 1 , promotor de proteínas de unión a CCAAT , y elemento de respuesta a cAMP proteína de unión, lo que indica que estos factores de transcripción pueden regular la expresión de grelina .

El DNA genómico fue extraído de células obtenidas por raspado bucal, usando la técnica de extracción de DNA con TSNT (Tritón, SDS, NaCl y Tris-EDTA). La genotipificación de los SNPs fue llevada a cabo usando PCR-RFLP (polymerase chain reaction, restriction fragment length polymorphism).

Los primers para el locus específico de cada polimorfismo fueron diseñados usando el software primer 3.

Para rs27647 (GHRL-1) se usaron los primers 5' CAGCAGGACTTGATAGGGGC3' (Forward) y 5' GGCATCTGACCTCCACTGTT3' (Reverse). Para rs26802 (GHRL-2) se usaron los primers 5' GGCTTACCATCTGGGGTCC 3' (Forward) Y 5' GGGATGGGGTTGCTGGTTTA 3' (Reverse). Para rs27647 y rs26802 las condiciones de la PCR fueron las siguientes: desnaturalización inicial 95°C por 5 minutos, amplificación por 35 ciclos de 95°C por 30 s, 64°C por 30 s, 72°C por 30 s. un paso final de extensión a 72°C por 10 min seguidos en el último ciclo de PCR.

La PCR se desarrolló en un volumen final de 30 µl que contenían ~800 ng/µl de DNA genómico, 10pM de cada primer, 2mM de dNTPs, 0.4 µl Platinum® TaqDNA polimerasa y 1.5 mM de MgCl₂.

Para analizar el polimorfismo rs27647 se realizó digestión con 5 unidades de enzima de restricción MesI a 37°C por 15 minutos, para rs26802 se realizó la digestión con 5 unidades de enzima TseI a 65°C por 15 minutos, y los fragmentos obtenidos e visualizaron en el fotodocumentador en un gel de agarosa al 3%.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

En la tabla 1 se muestra la frecuencia de Hardy Weinberg en GHRL-1, donde se observa que la población está en equilibrio ya que se obtiene una $p > 0.05$, además en la imagen 1 se ilustra el equilibrio al tener un gráfico para los resultados de GHRL-1 donde se tiene que el 47.06% de la población corresponde a un polimorfismo heterocigoto para T/C, el 47.06% a T/T (ancestral) y 5.88% a polimorfismo homocigoto para C/C.

En la tabla 2 se observa la frecuencia de Hardy Weinberg en GHRL-2, donde se observa que la población no está en equilibrio ya que se obtiene una $p < 0.05$, de acuerdo a la imagen 2 para GHRL-2 se observa que el 97% de la población corresponde a un polimorfismo heterocigoto para T/G.

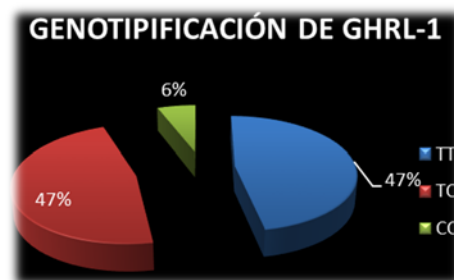


IMAGEN 1: genotipificación del polimorfismo GHRL-1, donde se muestra que el 47% de la población tiene polimorfismo heterocigoto, 47% tiene el alelo ancestral y un 6% el polimorfismo homocigoto en el rs27647.



IMAGEN 2: genotipificación del polimorfismo GHRL-2, donde se muestra que el 97% de la población tiene polimorfismo heterocigoto en el rs26802.

Tabla 1: RESULTADOS PARA GHRL-1(rs27647)

GHRL-1 (rs26802)	GENOTIPIFICACIÓN			FRECUENCIA H-W			ALELOS		
	TT	TC	CC	TT	TC	CC	T	C	P
1. MUESTRA TOTAL	8	8	1	8.47 (49.83%)	7.06 (41.52%)	1.47 (28.65%)	24(70.59%)	10(29.49%)	0.5825
2. NIÑOS CON BAJO PESO	3	3	0	3.38 (56.25%)	2.25 (37.5%)	0.38 (6.25%)	9 (75%)	3 (25%)	0.4142
3. NIÑOS CON PESO NORMAL	4	4	1	4(44.44%)	4(44.4%)	1(11.11%)	12(66.67%)	6(33.33%)	1
4. NIÑOS CON PESO ALTO	0	1	0	0.25 (25%)	0.5 (50%)	0.25 (25%)	1(50%)	1(50%)	0.3173

Tabla 2: RESULTADOS PARA GHRL-2 (rs26802)

GHRL-2 (rs26802)	GENOTIPIFICACIÓN			FRECUENCIA H-W			ALELOS		
	TT	TG	GG	TT	TG	GG	T	G	P
5. MUESTRA TOTAL	0	29	1	7.01 (23.36%)	14.98 (49.94%)	8.01 (26.96%)	29(48.33%)	31(51.67%)	0
6. NIÑOS CON BAJO PESO	0	6	0	1.5 (25%)	3 (50%)	1.5 (25%)	6 (50%)	6 (50%)	0.0143
7. NIÑOS CON PESO NORMAL	0	21	1	5.01 (22.78%)	10.98 (49.9%)	6.01 (27.32%)	21(43.73%)	23(52.27%)	0
8. NIÑOS CON PESO ALTO	0	1	0	0.25 (25%)	0.5 (50%)	0.25 (25%)	1(50%)	1(50%)	0.3173

CONCLUSIONES:

De acuerdo a los datos obtenidos mediante los z-score, se observa que para el polimorfismo GHRL-1 no hay diferencias significativas entre los infantes evaluados a excepción del parámetro talla según la edad, pero en este caso la distribución es equilibrada, por lo que no se logra relacionar este polimorfismo con su peso al nacimiento.

De otro modo, para el polimorfismo GHRL-2, se muestran varias diferencias significativas para los parámetros que empleamos, para este caso se observan que 29 de los niños evaluados tienen el polimorfismo heterocigoto, y solo 1 el polimorfismo homocigoto, ninguno de ellos contó con el alelo ancestral, para los resultados de este gen observamos que hay diferencia con el HAPMAP MEX reportado en la base de datos de

SNP, ya que la distribución mostrada está en equilibrio, por lo que se observa la diferencia entre

La población de la región centro de México, y la población mexicana tomada para el estudio de dicho HAPMAP MEX.

En conclusión aún falta mucho terreno por cubrir para tener un monitoreo de la salud neonatal y la prevención de enfermedades de la vida adulta, pero se espera seguir en este ramo de la investigación.

AGRADECIMIENTOS

Agradezco de corazón a mi familia Sandoval García que siempre me han apoyado en las

Tabla 3: RESULTADOS PARA GHRL-1(rs 27647)

GHRL-1 (rs26802)	GENOTIPIFICACIÓN (UTILIZANDO Z-SCORES QUE INDICAN EL CRECIMIENTO POSTNATAL).							
	TT	TG	GG	SC	GL	CM	F _o	F
PESO AL NACER.	8	8	1	-193.086	1	-193.086	-43.763	0.5825
W/L	5	7	1	-9.827	1	-9.827	-2.121	0.4944
L/A	8	8	1	2.528	1	2.528	2.412	0.5825
W/A	6	7	1	-2.181	1	-2.181	-0.631	0.5844
BMI/A	6	7	1	-12.644	1	-12.644	-2.735	0.5844

Tabla 4: RESULTADOS PARA GHRL-1(rs 27647)

GHRL-2 (rs26802)	GENOTIPIFICACIÓN (UTILIZANDO Z-SCORES QUE INDICAN EL CRECIMIENTO POSTNATAL).							
	TT	TG	GG	SC	GL	CM	F _o	F
PESO AL NACER.	0	29	1	0.427	1	0.427	1.276	0
W/L	0	17	1	1.000	1	1.000	0.279	0.0001
L/A	0	18	1	-9.713	1	-9.713	-2.698	0.0001
W/A	0	29	1	9.323	1	9.323	6.812	0
BMI/A	0	18	1	1.057	1	1.057	0.222	0.0001

En las tablas 3 y 4 se utilizaron datos de z-score obtenidos mediante el programa WHOANTHRO [4] donde W/L se refiere al peso según la talla, L/A talla según la edad, W/A peso según la edad, BMI/A índice de masa corporal según la edad.

decisiones que tomo así como en mis proyectos, siempre estaré en deuda con ustedes.

A la familia Herrera Gutiérrez que se convirtieron en un gran apoyo durante este proyecto de investigación.

A mis compañeros de Verano por el apoyo brindado y los buenos momentos.

A la persona que desde un inicio siguió de cerca mi proyecto y mi desempeño y se volvió mi mentor, Rubén, muchas gracias.

A la Doctora María Luisa Lazo, y la Dra. Martha Hernández gracias por este proyecto y por la oportunidad de llevarlo a cabo, descubriendo un campo nuevo para mí.

A mi gran amigo David Núñez, siempre has sido un gran apoyo, muchas gracias por alentarme a tomar esta aventura que resulto ser extraordinaria.

A la Universidad de Guanajuato, por ser una institución de alto nivel y llevar a cabo actividades enriquecedoras para nosotros como estudiantes,

REFERENCIAS

[1]Peraza Roque, G. J., Pérez Delgado, S. D. L. C., & Figueroa Barreto, Z. D. L. A. (2001). Factores asociados al bajo peso al nacer. *Revista Cubana de Medicina General Integral*, 17(5), pag490-496.

[2]Yin, X., Li, Y., Xu, G., An, W., & Zhang, W. (2009). Ghrelin fluctuation, what determines its production? *Acta biochimica et biophysica Sinica*, 41(3), pag188-197.

[3] Fidanci, K., Meral, C., Süleymanoğlu, S., Pirgon, Ö., Karademir, F., Aydınöz, S.,...& Göçmen, İ. (2010). Ghrelin levels and postnatal growth in healthy infants 0-3 months of age. *Journal of clinical research in pediatric endocrinology*, 2(1), 34.

[4]WHO Anthro para computadoras personales, versión 3, 2009: Software para evaluar el crecimiento y desarrollo de los niños del mundo.