

Obesidad Infantil, resistencia a la insulina y el polimorfismo (CAG)_n del gen *ATXN2*

Guzmán-López Rufina, García-Cruz Diana, Magallanes-Ordoñez José de J., Siliceo-Murrieta José, Dávalos-Rodríguez Nory O, Ruiz-Mejía Rosalba, Madrigal-Ruiz Perla M., Cruz-Bastida Jareth M., Cruz-Bastida Jafet S., Duque-Bautista Horacio, Ramón-Canul Lorena, Castro-Juárez Carlos J., Ramírez-García Sergio A, miembros del *Grupo Multidisciplinario para el Estudio Integral de las Enfermedades Metabólicas e infecciosas en Población Mexicana*.

Autor para correspondencia

Dr. Sergio Alberto Ramirez Garcia Profesor Investigador Titular B, Instituto de Investigaciones sobre la Salud Pública, Universidad de la Sierra Sur, Nivel C del Sistema Nacional de Investigadores, CONACYT. Teléfono/Fax 01(376) 76 5-23-25. Calle Guillermo Rojas Mijangos S/N, Esq. Av. Universidad Col. Ciudad Universitaria, Miahuatlán de Porfirio Díaz, Oaxaca., México C.P. 70800.
Contacto al correo electrónico: sergio7genetica@hotmail.com

Palabras clave: Ataxina-2, obesidad, polimorfismo genético, resistencia a la insulina.

Keywords: Ataxin-2, genetic polymorphism, insuline resistance, obesity.



Obesidad infantil, resistencia a la insulina y el polimorfismo (CAG)_n del gen *ATXN2*

Guzmán-López R^a, García-Cruz D^b, Magallanes-Ordoñez JJ^c, Siliceo-Murrieta J^d, Dávalos-Rodríguez N^b, Ruiz-Mejía R^e, Madrigal-Ruiz PM^e, Cruz-Bastida JM^f, Cruz-Bastida JS^f, Duque-Bautista H^d, Ramón-Canul L^d, Castro-Juárez CJ^d, Ramírez-García SA^d, miembros del Grupo Multidisciplinario para el Estudio Integral de las Enfermedades Metabólicas e infecciosas en Población Mexicana

Resumen

Introducción

El gen *ATXN2* codifica para la proteína ataxina-2, la cual es una proteína implicada en la neuritogénesis. En modelos murinos, su deficiencia en células hipotalámicas embrionarias se asocia con el desarrollo de obesidad, hígado graso y disminución de la expresión del receptor de insulina. En México no se ha estudiado esta asociación por lo que el objetivo del presente estudio fue analizar la existencia de una relación entre la distribución de alelos del VNTR (número variable de las repeticiones en tándem) (CAG)_n en el exón 1 de *ATXN2* y obesidad en pacientes pediátricos con resistencia a la insulina.

Material y Métodos

De marzo de 2010 a agosto de 2014 a través de la clínica de enfermedades crónico degenerativas de la Unidad de Investigación en Epidemiología del Sistema Municipal para el Desarrollo Integral de la Familia (DIF) en Chapala, Jalisco, y de la Fundación Mexicana de Enfermedades Genéticas y Medicina Genómica AC se analizaron 785 niños originarios y residentes de la ribera de Chapala, con ancestría indígena en la región de cinco generaciones atrás. Se seleccionaron aquellos con índice HOMA mayor 2. Formándose dos grupos, uno conformado por 29 niños con obesidad grado II y el otro grupo formado por 56 probandos sin obesidad y sin sobrepeso. Se determinó el polimorfismo de *ATXN2* por PCR punto final y se analizó la asociación con el diagnóstico de obesidad.

Resultados

No se encontró asociación entre el VNTR de *ATXN2* y la obesidad infantil en nuestra población. Las frecuencias genotípicas y alélicas son similares a las reportadas en otras poblaciones. Se encontró como polimórfico el alelo de 11 repeticiones.

Discusión

En este estudio, el VNTR de *ATXN2* no demostró influencia en el desarrollo de obesidad infantil en habitantes y residentes de la Ribera de Chapala, Jalisco.

Palabras clave: Ataxina-2, obesidad, polimorfismo genético, resistencia a la insulina.

- a. Programa de Maestría en Salud Pública, Universidad de la Sierra Sur, Miahuatlán de Porfirio Díaz, Oaxaca, MX.
- b. Instituto de Genética Humana, Departamento de Biología Molecular y Genómica, Centro Universitario de Ciencias de la Salud (CUCS), Universidad de Guadalajara, Guadalajara, MX.
- c. Hospital Regional Dr. Valentín Gómez Farias, ISSSTE, Guadalajara, MX.
- d. Instituto de Investigaciones sobre la Salud Pública, Universidad de la Sierra Sur, Miahuatlán de Porfirio Díaz, Oaxaca, MX.
- e. Laboratorio de Bioquímica, Departamento de Biología Molecular y Genómica, CUCS, Universidad de Guadalajara, Guadalajara, MX.
- f. Laboratorio de Genética Forense, Licenciatura en Criminología y Criminalística, CLEU, Oaxaca de Juárez, MX.

Autor para correspondencia

Dr. Sergio Alberto Ramírez García
Profesor Investigador Titular B, Instituto de Investigaciones sobre la Salud Pública, Universidad de la Sierra Sur, Nivel C del Sistema Nacional de Investigadores, CONACYT. Telephone/Fax 01(376) 76 5-23-25. Calle Guillermo Rojas Mijangos S/N, Esq. Av. Universidad Col. Ciudad Universitaria, Miahuatlán de Porfirio Díaz, Oaxaca, México C.P. 70800.
Contacto al correo electrónico: sergio7genetica@hotmail.com

Childhood obesity, insulin resistance and the polymorphism (CAG)_n of the ATXN2 gene

Abstract

Introduction.

The ATXN2 gene codes for the protein ataxin-2, which is a protein involved in the neuritogenesis. In murine models, its deficiency in embryonic hypothalamic cells is associated with the development of obesity, fatty liver and decreased expression of the insulin receptor. In Mexican population there has not been a study analyzing this association so the objective of the present study was to analyze the existence of a relationship between the distribution of alleles of the VNTR (variable number of tandem repeats) (CAG)_n in exon 1 of ATXN2 and obesity in pediatric patients with insulin resistance.

Material and Methods.

From March 2010 to August 2014 through the clinic for chronic degenerative diseases of the Research Unit in Epidemiology of the Municipal System for the Integral Development of the Family (DIF) in Chapala, Jalisco, and the Mexican Foundation for Genetic Diseases and Genomic Medicine AC analyzed 785 native children and residents of the riverside of Chapala, with indigenous ancestry in the region of five generations ago. Those with index were selected HOMA mayor 2. Two groups are formed, one consisting of 29 children with obesity grade II and the other group formed by 56 probands without obesity and without overweight. The polymorphism of ATXN2 by PCR end-point and the association with the diagnosis of obesity was analyzed.

Results.

No association was found between ATXN2 VNTR and childhood obesity in our population. The Genotypic and allelic frequencies are similar to those reported in other populations. It was found as polymorphic the allele of 11 repetitions.

Discussion.

In this study, the ATXN2 VNTR showed no influence on the development of childhood obesity in inhabitants and residents of the Ribera de Chapala, Jalisco.

Key Words: Ataxin-2, genetic polymorphism, insuline resistance, obesity.

Introducción

El gen *ATXN2* codifica para la proteína ataxina-2, la cual es una proteína implicada en la neuritogénesis, lleva a cabo su función al unirse al ARN e interactuar con el poli(A). Su localización es en los ribosomas del retículo endoplasmático rugoso y en modelos murinos, su deficiencia en células hipotalámicas embrionarias conduce a la disminución del gen *ATXN2*, *Insr*, y *Mc4r*, lo que se ha asociado con el desarrollo de obesidad, hígado graso y disminución de la expresión del receptor de insulina. En humanos, se ha reportado que la expansión anormal del número variable de repeticiones en tándem “microsatélites” (del inglés VNTR) (CAG)_n en el exón 1 de *ATXN2* está relacionada con el desarrollo de ataxia espinocerebelosa (>33 repeticiones). Los alelos superiores a 22 repeticiones, así como el homocigoto C para el polimorfismo de un nucleótido (SNP) rs695872 que flanquea al VNTR, están asociados con obesidad severa análoga a las mutaciones en los genes *LEP*, *LEPR* *MC4* en población del Reino Unido. También la expansión de alelos largos dentro del rango normal, se ha asociado a Diabetes. Considerando estas premisas, el objetivo del presente estudio fue analizar la existencia de una relación entre la distribución de alelos del VNTR (CAG)_n en el exón 1 de *ATXN2* y obesidad en pacientes pediátricos con resistencia a la insulina.

Material y métodos

Pacientes

De marzo de 2010 a agosto de 2014 a través de la clínica de enfermedades crónico degenerativas de la Unidad de Investigación en Epidemiología del Sistema Municipal para el Desarrollo Integral de la Familia (DIF)-Chapala, y de la Fundación Mexicana de Enfermedades Genéticas y Medicina Genómica AC se analizaron 785 niños originarios y residentes de la ribera de Chapala, con ancestros indígenas en la región de cinco generaciones atrás. Se seleccionaron aquellos con índice HOMA mayor 2. Formándose dos grupos, uno conformado por 29 niños con obesidad grado II y el otro grupo formado por 56 probandos sin obesidad y sin sobrepeso. La edad promedio osciló entre 8 y 11 años, todos del sexo masculinos. La obesidad se definió de acuerdo con los criterios de la OMS-2004, mediante el índice de masa corporal.⁵

Análisis bioquímico

Las muestras de sangre fueron tomadas en ayuno de 8 horas. Los niveles de glucosa, fue determinada mediante el kit calorimétrico de Human Co™ Glucosa oxidasa, por espectrofotometría con el equipo Beckman Coulter DU730™. La insulina sérica se determinó por RIA por Laboratorios TOLSA™. Los índices de resistencia a la insulina fueron determinados mediante las siguientes fórmulas: HOMA-IR= (insulina en ayuno (μU/ml)* glucosa en ayuno (mmol/l))/22.5. El índice QUICKI= 1/[log insulina plasmática (uU/ml) + log glucosa plasmática en ayuno (mg/dl)].⁶

Amplificación por PCR-punto final de la expansión CAG del gen *ATXN2* y electroforesis

A todos los participantes se les extrajeron 5mL de sangre periférica por punción venosa en tubos BD Vacutainer para extraer ADN genómico mediante el método de Miller modificado y realizar la cuantificación de insulina sérica. Al tomar las muestras inmediatamente se centrifugaron a 3500 rpm, se extrajo el plasma y fue almacenado en congelación a menos 70 grados hasta el momento en que se procesaron.

Se utilizaron los iniciadores:

5'-GGGCCCCTCACCATGTCG-3',
5'-CGGGCTTGCGGACATTGG-3',

Estos son sintetizados, diseñados y han sido probados por la compañía Sigma Aldrich™, previamente diseñados y probados. El Programa de Amplificación fue el siguiente; 1.- 96°C 3 min, 2.-96°C 60 segundos, 3.-59°C 30 segundos, 4.- 72°C 1 min, 5.-28 veces del ciclo 2 al 4.⁷ El producto de PCR se mezcló con formamida desionizada y se desnaturalizó en baño María durante 10 minutos, posteriormente se colocó en hielo frapé durante 3 minutos para su corrimiento electroforético. Las condiciones de amplificación fueron las descritas por Magaña y colaboradores.⁷ Los productos amplificados fueron sometidos a electroforesis en geles de poliacrilamida al 8% (19:1) 180V durante 2 horas. Posteriormente, los geles fueron teñidos con nitrato de plata (Figura 1). La identificación de las repeticiones se realizó con base en la clasificación de los productos de PCR, 106 pb corresponde al alelo de 14 repeticiones, 22 repeticiones, 130 pb corresponde al alelo de mayor frecuencia y 154 para el alelo de 30 repeticiones (Tabla 1).⁸ Las reacciones de PCR y electroforesis fueron realizadas e interpretadas por triple ciego.

Análisis estadístico

Se utilizó la Ji-cuadrada de Pearson (χ^2), para analizar si era significativa la distribución de alelos y genotipos en los pacientes pediátricos obesos, para ello se consideraron valores de $p < 0.05$ como significativos.

Aspectos éticos

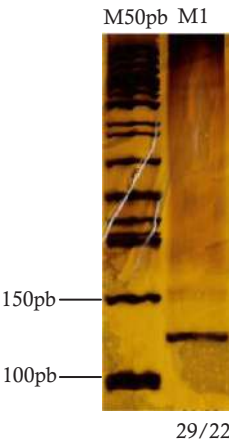


Figura 1. Electroforesis en poliacrilamida al 8% PCR del VNTR de *ATXN2*. Se muestra la amplificación del alelo de 22 repeticiones y el de 29. M1=muestra 1. M50pb. Marcador de 50 pares de bases, Gold Biotechnology D100-1000.

La presente investigación se realizó basada en la declaración de Helsinki revisada en el 2008 así como en la Ley General de Salud en México. El trabajo fue aprobado por las comisiones institucionales de Investigación y Bioética del Sistema Municipal para el Desarrollo Integral de la Familia (DIF)-Chapala con fecha de autorización del 12 de marzo del 2010. Se obtuvo el consentimiento informado de los padres y/o tutores de los adolescentes incluidos, en el que autorizaron que a sus hijos o tutorados aportaran una muestra de sangre para la evaluación bioquímica y molecular. También autorizaron la publicación de los resultados clínicos, bioquímicos y moleculares con fines académicos y/o científicos, guardando el anonimato de los datos personales y legales.

Resultados

En la población total analizada el genotipo más frecuentemente encontrado fue el homocigoto para 22 repeticiones con un 88.23% y el heterocigoto 22/25 con 3.52%, el resto de genotipos encontrados se aprecia en la tabla 1. En cuanto a los alelos, el más frecuente es el de 22 repetidos con 94.11%, le siguió en frecuencia el alelo de 25 repeticiones con 1.74% y el alelo de 11 repetidos con 1.17, los demás alelos son variantes raras en la población analizada (Tabla 2).

Por otra parte el genotipo más frecuente en el grupo de pacientes con obesidad y sanos es el homocigoto de 22 repetidos. Mientras que el alelo más común es el de 22 repetidos y le sigue el de 25 repeticiones. No se encontró asociación significativa con obesidad a nivel genotipo ($\chi^2=1.27$, $p=0.2594$) o alelos (Figura 2).

Tabla 1. Identificación de los repetidos CAG mediante escala de pares de bases del VNTR de *ATXN2*

pb observadas	Número de Repetidos CAG	pb observadas	Número de Repetidos CAG
106	14	139	25
109	15	142	26
112	16	145	27
115	17	148	28
118	18	151	29
121	19	154	30
124	20	157	31
127	21	160	32
130	22	163	33
133	23	166	34
136	24	169	35

Tabla 2. Frecuencia de alelos y genotipos en la población analizada

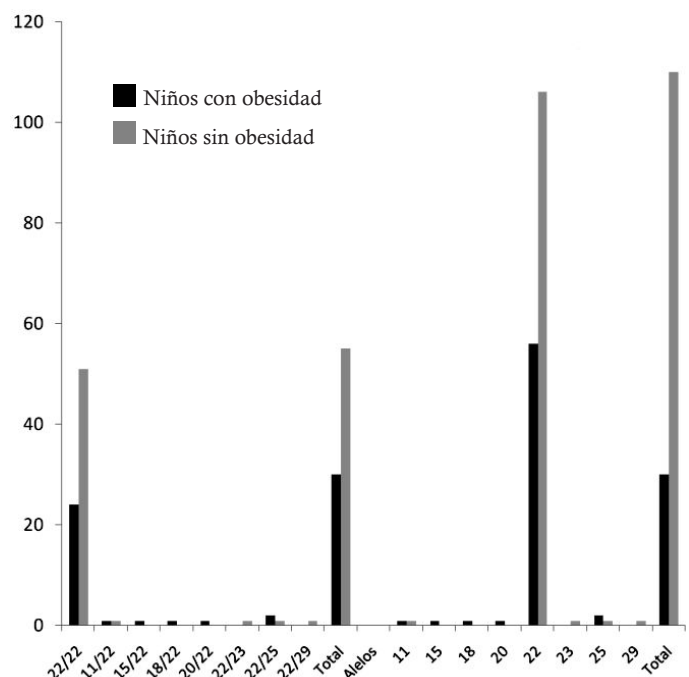
Genotipos	N	Frecuencia (%)	Alelos	N	Frecuencia (%)
22/22	75	88.2353	11	2	1.1765
11/22	2	2.3530	15	1	0.5882
15/22	1	1.1765	18	1	0.5882
18/22	1	1.1765	20	1	0.5882
20/22	1	1.1765	22	160	94.1176
22/23	1	1.1765	23	1	0.5882
22/25	3	3.5294	25	3	1.7647
22/29	1	1.1765	29	1	0.5882
Total	85	100	Total	170	100

Discusión

Este estudio es el primero que revela que el VNTR2 de *ATXN2* no contribuye a la predisposición de obesidad infantil asociada con resistencia a la insulina. Las frecuencias alélicas y genotípicas son muy similares a las reportadas en población del centro de México y occidente, siendo el repetido de 22 el más frecuente, seguido del de 25 repetidos.⁷⁻⁸ Esto sugiere que el *locus* tiene una tasa de mutación baja y que es una región altamente conservada, como ya se ha descrito previamente.⁷ Sin embargo a diferencia de lo que ya se ha reportado en población mexicana, se encontró como polimórfico el alelo de 11 repeticiones, con lo cual se concluye que el polimorfismo CAG es un VNTR, ya que por lo menos tiene dos alelos con una frecuencia superior al 1%.

Este es el primer estudio sobre la diversidad genética de la región de la Ribera de Chapala en Jalisco, México. La relevancia de esto, radica en que los nativos de esta región tuvieron su origen genético a partir de la mezcla del grupo nahuatl migrante del legendario Aztlán, en los purépechas tarascos y huicholes durante el siglo XII. A partir de la conquista, esta mezcla ha continuado mezclándose con españoles, pero también con migrantes extranjeros desde finales del siglo XIX (ingleses, noruegos); a partir del 2003 en su mayor parte blancos no hispanos (norteamericanos), caucásicos canadienses y con una menor proporción con caucásicos europeos (italianos e irlandeses) y latinos de América del Sur (argentinos). También se ha mezclado a partir de 1995 a la fecha con grupos étnicos migrantes del Estado de Oaxaca; mixtecos, zapotecas y triqui, por cuestiones laborales.⁸⁻¹¹

En el presente estudio se incluyeron nativos con ancestros originarios de la Ribera independiente de su mezcla genética

Figura 2. Genotipos y alelos del VNTR de *ATXN2* en población pediátrica de la Ribera de Chapala.

(la cual no fue objetivo estimar del presente estudio), por lo cual las frecuencias de alelos y genotipos del polimorfismo estudiado son una contribución sustancial a la epidemiología y antropología genética de la población mexicana.

En población inglesa el VNTR de *ATXN2* se ha encontrado como responsable de obesidad.³ En la población analizada de la Ribera de Chapala no, probablemente se explica ya que es una población seleccionada, pero se debe seguir explorando en la población mexicana y en otras poblaciones latinas, ya que cada población tiene su composición genética diferente, por lo cual los resultados tienen que ser replicados en otros estudios de genes candidato.¹²

Conclusiones

El VNTR2 de *ATXN2* no contribuye a la predisposición de obesidad con resistencia a la insulina en la población infantil analizada de la Ribera de Chapala. Además se encontró que en esta población de nativos el alelo de 11 repetidos es polimórfico. Estos hallazgos no han sido descritos previamente siendo una contribución importante a la diversidad genética de la población mexicana.

Declaración de intereses y agradecimientos

Los autores del presente trabajo declaramos que no existe conflicto de intereses. Se agradece por su financiamiento a PROMEP-SEP Convocatoria 2013 para el fortalecimiento de cuerpos académicos, laboratorios TOLSA y la Fundación Mexicana de Enfermedades Genéticas y Medicina Genómica AC.

Referencias bibliográficas

1. Lastres-Becker I, Brodessa S, Lütjohann D, Azizov M, Buchmann J, Hintermann E, et al. Insulin receptor and lipid metabolism pathology in ataxin-2 knock-out mice. *Hum Mol Genet* 2008 15;17(10):1465-81.
2. Ma L, Hanson RL, Traurig MT, Muller YL, Kaur BP, Perez JM, et al. Evaluation of A2BP1 as an obesity gene. *Diabetes* 2010;59(11):2837-45.
3. Figueroa KP, Farooqi S, Harrup K, Frank J, O'Rahilly S, Pulst SM. Genetic variance in the spinocerebellar ataxia type 2 (*ATXN2*) gene in children with severe early onset obesity. *PLoS One* 2009; 4(12):e8280.
4. Auburger G, Gispert S, Lahut S, Omür O, Damrath

- E, Heck M, *et al.* 12q24 locus association with type 1 diabetes: SH2B3 or ATXN2? *World J Diabetes.* 2014;5(3):316-27.
- 5.-WHO Expert Consultation. Appropriate body-mass index for Asian populations and its implications for policy and intervention strategies. *Lancet* 2004;363:157-63.
- 6.-Patarrão RS, Wayne LW, Macedo MP. Assessment of methods and indexes of insulin sensitivity. *Rev Port Endocrinol Diabetes Metab* 2014;9(1):65-73.
- 7.-Magaña JJ, Vergara MD, Sierra-Martínez M, García-Jiménez E, Rodríguez-Antonio F, Gómez MR, *et al.* Análisis molecular de los repetidos CAG en pacientes mexicanos con ataxia espinocerebelosa tipo 2. *Gac Med Mex* 2008;144(5).
- 8.-Flores-Alvarado LJ, Dávalos-Rodríguez N, García-Cruz D, Madrigal-Ruiz P, Ruiz-Mejía R, Aguilar Aldrete, *et al.* El polimorfismo (CAG)_n del gen ATXN2, nuevo marcador de susceptibilidad para diabetes mellitus tipo 2. *Rev Panam Salud Publica.* 2016. En prensa.
- 9.-Covarrubias F, Cruz M, Ojeda A. El paisaje prehispánico de la ciénaga de Chapala. *Tecsisotecatl* 2008; 1(4):1-15.
- 10.-Huerta Barrios J. *Plan de desarrollo municipal 2012-2030.* Chapala, Jalisco, México. 2012. Gobierno Municipal de Chapala.
- 11.-Chavez E, Cobo S. *Extranjeros residentes en México.* México, DF. 2012. Secretaría de Gobernación México.
- 12.-Martínez Cortés G, Salazar FJ, Fernández LG, Rubi R, Rodríguez C, Velarde JR, *et al.* Admixture and population structure in mexican-mestizos based on paternal lineages. *J Hum Genet* 2012;57(9):568-74.