

POLIMORFISMOS ASOCIADOS AL PESO AL NACIMIENTO Y LA INSULINA FETAL

Velázquez Villafaña, Marion (1), Aguilera Venegas, Ivette Guadalupe (2), Mora Peña, Julia del Socorro (2), Rangel Salazar, Rubén (2), Lazo de la Vega Monroy, María Luisa (2)

1 [Lic. Químico Farmacéutico Biólogo, Universidad de Guanajuato] | Dirección de correo electrónico: [deriaru@gmail.com]

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

RESUMEN

Introducción: Los neonatos con bajo peso al nacer tienen mayor riesgo de morbilidad neonatal y de desarrollar enfermedades durante la adultez. La hipótesis de la insulina fetal propone que una asociación entre bajo peso al nacimiento, una resistencia a la insulina y menor secreción de la misma en la adultez está mediada genéticamente. Dos polimorfismos: rs11708067 y rs7754840 identificados en *ADCY5* y *CDKAL1* se asocian con riesgo de diabetes mellitus tipo 2 y menor funcionamiento y secreción de insulina. **Materiales y métodos:** Se extrajo ADN de sangre o tejido de cordón umbilical de 33 neonatos de población mestiza de la región centro de México y mediante PCR-RFLP se genotipificaron ambos genes. **Resultados:** las frecuencias alélicas y genotípicas de *ADCY5* fueron: A=0.66 y G=0.33; AA=0.44, AG=0.44 y GG=0.11, $p=0.1917$; y de *CDKAL1*: G=0.66 y C=0.33; GG=0.44, CG=0.44 y CC=0.11, $p=0.6015$, estando ambos en equilibrio Hardy-Weinberg. No se asoció el genotipo en *ADCY5* con peso al nacimiento ni insulina fetal, mientras que *CDKAL1* está asociado al peso para la talla al nacimiento, la glucosa fetal, y posiblemente a la insulina fetal. **Discusión-conclusiones:** Dadas las diferencias de los genotipos encontradas, es necesario aumentar la muestra para sustentar la hipótesis de la insulina fetal.

ABSTRACT

Introduction: Infants with low birth weight have increased risk of neonatal morbidity and mortality and elevated risk to develop adulthood diseases. The fetal insulin hypothesis proposes that an association between low birth weight, insulin resistance and decreased insulin secretion in adulthood is primarily genetically mediated. Two polymorphisms: rs11708067 and rs7754840 identified in *ADCY5* and *CDKAL1* are associated with type 2 diabetes mellitus risk and impaired insulin function and secretion. **Materials and Methods:** DNA was extracted from umbilical cord blood or tissue from 33 mestizo infants population of the central region of Mexico and by PCR-RFLP genotyping was performed for both polymorphisms. **Results:** Genotype and allele frequencies were *ADCY5*: A = 0.66 and G = 0.33; AA = 0.44, AG = 0.44 and GG = 0.11, $p = 0.1917$; and *CDKAL1*: G = 0.66 and C = 0.33; GG = 0.44, CG = 0.44 and CC = 11.11%, $p = 0.6015$, both are in Hardy-Weinberg equilibrium. *ADCY5* was not associated with birthweight or fetal insulin, whereas *CDKAL1* is associated with birthweight by length, fetal glucose, and possibly fetal insulin. **Discussion-Conclusions:** Given the differences in the genotypes of each gene against each variable, it is necessary to increase the sample to support the fetal insulin hypothesis.

Palabras Clave

ADCY5; CDKAL1; peso al nacimiento; Insulina; Polimorfismos

INTRODUCCIÓN

Peso al nacimiento

El peso al nacer es un indicador principal para evaluar la salud de los neonatos ya que predice la supervivencia inmediata y es indispensable para evaluar el crecimiento subsiguiente. Sin embargo, para indicar si el peso alcanzado por el neonato es o no apropiado, se debe comparar con patrones de referencia de acuerdo con la edad gestacional y el sexo, estableciendo puntos de corte que indiquen normalidad o alteración de su crecimiento [1]. Existen curvas de referencia las cuales están diseñadas para evaluar distintos indicadores neonatales, entre ellos, el peso de los neonatos de acuerdo a su edad gestacional las cuales proporcionan un valor crucial para la salud de los neonatos [2].

De acuerdo al consenso latinoamericano para niños pequeños para la edad gestacional (*Small for Gestational Age*), éste se define como el peso al nacer y/o la longitud al nacer dos desviaciones estándar por debajo de la media para la población de referencia de acuerdo a la edad gestacional o con peso por debajo de la percentila 10 para su edad gestacional [3]. La Organización Mundial de la Salud señala que si no se dispone de la edad gestacional, el peso al nacimiento <2500 g se considera como SGA [4] y aquellos cuyo peso al nacimiento es >4000g o se encuentra por encima de la percentila 90 con respecto a otros niños del mismo sexo e igual edad gestacional se consideran LGA (*Large for Gestational Age*) [5]. 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 niños con bajo peso al nacer corren un mayor riesgo de morbilidad neonatal [6] además de un riesgo elevado de desarrollar enfermedades durante la vida adulta como resistencia a la insulina, mayores concentraciones de insulina en ayunas, incremento de incidencia de diabetes mellitus tipo 2 y enfermedades cardiovasculares [7].

Regulación y metabolismo de la glucosa e insulina

La glucosa es el principal sustrato energético para el feto, esencial para un adecuado crecimiento y

desarrollo, y se transfiere de la madre al feto por placenta mediante difusión facilitada por medio de transportadores de glucosa [8].

Los niveles de glucosa en sangre materna durante el embarazo son determinantes para la secreción de la insulina fetal y del crecimiento fetal [9]. El consumo de glucosa por los tejidos fetales es regulado por transportadores de glucosa que aumentan o disminuyen en respuesta de cambios agudos y crónicos en las concentraciones de glucosa fetal, y en condiciones de restricción de crecimiento intrauterino [10]. La secreción de insulina en respuesta a glucosa por el páncreas fetal es menor, comparada con el páncreas adulto [11] sin embargo, poco se conoce con respecto al metabolismo de la glucosa en el páncreas fetal, por las dificultades éticas y metodológicas que implican evaluar in vivo la secreción fetal pancreática en respuesta a diferentes estímulos durante el embarazo. Una alternativa para estudio del comportamiento de la insulina fetal su relación con polimorfismos y riesgo para el desarrollo de enfermedades en la vida adulta, así como para cualquier estudio metabólico fetal, es realizarlo utilizando sangre de cordón umbilical al nacimiento.

Hipótesis de la insulina fetal

La hipótesis de la insulina fetal descrita por Andrew Hattersley en 1999, propone que la asociación entre bajo peso al nacimiento y una resistencia a la insulina y su secreción en la adultez es principalmente mediada genéticamente. Esto podría resultar en un bajo crecimiento fetal mediado por insulina in útero así como una resistencia a la insulina en la niñez y adultez. El bajo peso al nacer, medidas de resistencia a la insulina, la intolerancia a la glucosa, diabetes e hipertensión, podrían ser fenotipos de un mismo genotipo. La idea central de la hipótesis de la insulina fetal es el concepto que el crecimiento fetal mediado por insulina sería afectado por factores genéticos fetales que regulan la secreción de la insulina fetal o la sensibilidad de los tejidos fetales a los efectos de la insulina. Si la hipótesis de la insulina fetal es correcta, los polimorfismos o mutaciones en genes que están asociados con resistencia a la insulina también se asociarán con el retraso del crecimiento fetal [12].

Polimorfismos en los genes ADCY5 y CDKAL1

El gen de la adenilato ciclasa 5 (ADCY5) codifica un miembro de las enzimas adenilil ciclasa de enlaces unidos a membrana. Las guanilato ciclasas se encargan de mediar la señalización por receptores acoplados a proteína G a través de la síntesis de cAMP (adenín mono fostato cíclico) como segundo mensajero. La actividad de la proteína codificada es estimulada por la subunidad Gs alfa de los receptores acoplados a proteína G y es inhibida por la proteína quinasa A, calcio y subunidades alfa Gi [13]. Estudios de asociación del genoma han identificado asociación entre variantes en el gen ADCY5 con el peso al nacimiento y riesgo de diabetes mellitus tipo 2. Un polimorfismo de este gen que ha mostrado asociación con peso al nacimiento y niveles de insulina es rs11708067 [14]. Además de una asociación con niveles de glucosa plasmática elevados [15] y alteraciones en la conversión de proinsulina a insulina [16]. Sin embargo, este polimorfismo no ha sido estudiado en población mexicana.

Por otro lado, el gen de CDKAL1 codifica una proteína miembro de la familia de las metiltiotransferasas sin embargo, la función de este gen aún no se conoce [17]. Existen alelos de riesgo para desarrollar diabetes mellitus tipo 2 en locus cercanos a este gen [18]. Un polimorfismo de CDKAL1 es el rs7754840 el cual se ha asociado con diabetes mellitus tipo 2, reducción en la secreción de insulina, mayores tasas de intolerancia a la glucosa, entre otras [19]. Este polimorfismo se ha estudiado en población mexicana, mostrando asociación significativa con diabetes mellitus tipo 2 en pacientes con dicha enfermedad no obesos [20].

El objetivo principal de este estudio es evaluar si las variantes genéticas rs11708067 en el gen ADCY5 y rs7754840 en el gen de CDKAL1 se asocian con las concentraciones de insulina neonatal, la resistencia a la insulina y el peso al nacimiento en una población de recién nacidos mexicanos.

MATERIALES Y MÉTODOS

Se seleccionó una cohorte de 33 neonatos de población mestiza de la región centro de México

en donde estudiantes de la maestría de Ciencias Médicas de la División de Ciencias de la Salud, Campus León se encargaron de la recolección de cordón umbilical y sangre del mismo de neonatos con previo consentimiento informado de la madre al igual que la recolección de datos clínicos y antropométricos del neonato, datos generales de la madre antes del trabajo de parto, y datos bioquímicos y hormonales.

Criterios de inclusión:

Neonatos a término (38-41 semanas), nacidos por parto eutócico o cesárea no electiva, que no presenten daños de sufrimiento fetal; cuyas madres cumplan los siguientes criterios: mayores de 18 años y menores de 35, sin diabetes mellitus, diabetes mellitus gestacional, sin enfermedad hipertensiva en el embarazo, sin enfermedades infecciosas crónicas, tabaquismo o alcoholismo durante el embarazo.

La recolección de muestra sanguínea de tejido de cordón umbilical se realizó después del nacimiento, pinzando y cortando el cordón umbilical. Se recolectaron 12 mL de sangre arterial de cordón, 10 mL se colocaron en un tubo para plasma y 2 mL en un tubo de suero para la extracción de ADN. Las muestras se transportaron al Departamento de Ciencias Médicas UG y se centrifugaron a 3500 rpm durante 15 min a temperatura ambiente para separación del suero.

La recolección de biopsia de tejido de cordón umbilical se realizó inmediatamente después del parto o cesárea, colocándolas en aluminio y en hielo seco para su transporte al Departamento de Ciencias Médicas UG donde se almacenaron a -80°C hasta el procesamiento.

Extracción de ADN

Se llevó a cabo la extracción de ADN de tejido de cordón umbilical o sangre de cordón por medio del método TSNT, fenol-cloroformo-isoamílico.

Integridad de ADN

Para confirmar la integridad del ADN extraído de tejido de cordón umbilical y sangre de cordón umbilical se realizaron geles de agarosa al 1% teñido con bromuro de etidio, a 80 V por 30 minutos.

Técnica de PCR-RFLP

Para cada una de las 33 muestras se colocaron 2 μL y 4 μL de ADN extraído de sangre y tejido de cordón umbilical, dependiendo sea cuál sea el caso, y 13 μL y 11 μL de la mezcla de reacción conteniendo TaqPol, dNTPs y oligonucleótidos para *ADCY5* o *CDKAL1* respectivamente, teniendo un total de 15 μL por muestra de reacción. Se realizó un control negativo, se colocaron las reacciones en un termociclador Maxygene II (Axygen) bajo las siguientes condiciones de amplificación: 94°C por 5 minutos, y 35 ciclos a 60 y 56°C para *ADCY5* y *CDKAL1* respectivamente por 35 segundos y 72°C por 10 minutos. Los amplicones fueron verificados mediante electroforesis en gel de agarosa al 2% con tinción de bromuro de etidio, a 80V por 45 minutos.

Se realizó una mezcla de reacción para *ADCY5* o *CDKAL1* conteniendo lo siguiente: H₂O, Buffer 10X NE, fragmento de amplificación, enzima HhaI y enzima AclI para cada reacción de cada gen respectivamente.

Los distintos productos de digestión se visualizaron por electroforesis en gel de agarosa al 3 y 4% teñido con bromuro de etidio a 80V por 70 minutos.

Análisis estadístico

Se analizó el equilibrio Hardy-Weinberg para ambos genes por χ^2 , los datos sobre los neonatos y de insulina se compararon por medio de un análisis de varianza (ANOVA) considerando las diferencias significativas con un valor de $p < 0.05$.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

El equilibrio Hardy-Weinberg y frecuencias para las 33 muestras analizadas del gen *ADCY5* es el siguiente:

Frecuencias genotípicas: AA=44.44%, AG=44.44% y GG=11.11%, frecuencias alélicas fueron: A=66.67% y G=33.33%, con una $p=0.1917$.

El equilibrio Hardy-Weinberg y frecuencias para las 33 muestras analizadas del gen de *CDKAL1* es el siguiente:

Frecuencias genotípicas: GG=44.44%, CG=44.44% y CC=11.11%, frecuencias alélicas fueron: G= 66.67% y C=33.33%, con una $p=0.6015$.

El equilibrio Hardy-Weinberg para ambos genes en la población es de una $p > 0.05$ lo cual indica que se encuentran en equilibrio.

En cuanto al análisis de varianza para *ADCY5* no se encontraron diferencias significativas para los genotipos contra el peso al nacimiento, peso para la talla, glucosa de cordón, insulina y HOMA-IR. A pesar de ello, comparando el genotipo contra la insulina fetal, se observa una disminución en la asociación con la población que posee el genotipo GG al igual que confrontándolo con el índice HOMA-IR. Sin embargo, la significancia es nula porque solo hay un neonato con genotipo GG del cual se tenía el dato de la insulina fetal.

Por otra parte, en el análisis para *CDKAL1* no se encontraron diferencias significativas al confrontar los genotipos contra sólo el peso al nacimiento. Sin embargo, se observó un posible efecto de mayor glucosa en la población de neonatos con genotipo CC. A pesar de que las diferencias de insulina fueron significativas al igual que el índice HOMA-IR, éstas no son representativas por tener sólo un dato para insulina fetal. En contraste, la comparación del peso para la talla entre los genotipos resultó significativo, lo cual podría sugerir que al parecer, los neonatos con genotipo CC tienen un menor peso para la talla. El resultado de tener 3 neonatos con genotipo CC con peso menor corresponde al 10% de la población total de estudio.

CONCLUSIONES

Al evaluar la variante genética rs11708067 en el gen de *ADCY5* se esperaba que éste tuviera una correlación a concentraciones de insulina neonatal, resistencia a la insulina y peso al nacimiento neonatal. Dado que estas diferencias no se encontraron, se sugiere que haya un incremento en la n poblacional ya que hubo aparentemente una disminución de insulina neonatal y del índice HOMA-IR para el genotipo con el alelo de riesgo. Cabe destacar que esta variante no ha sido estudiada en población mexicana y que las frecuencias genotípicas y alélicas son muy similares a las reportadas en el proyecto HapMap [21] para población México-americana.

Conforme a la evaluación de la variante genética rs7754840 en el gen de *CDKAL1* se esperaba lo mismo que en el gen de *ADCY5*. En este caso sí se observó una asociación del alelo de riesgo con un menor peso para la talla. Cabe destacar que el objetivo de este estudio podrá sustentarse con mayor seguridad aumentando la n poblacional, con el fin de probar la hipótesis de la insulina fetal.

AGRADECIMIENTOS

Agradezco a la Universidad de Guanajuato por el impulso a estos proyectos, al apoyo logístico y financiamiento del mismo. A la División de Ciencias de la Salud, Departamento de Ciencias Médicas, a la Dra. María Luisa Lazo de la Vega Monroy por todo el apoyo brindado en cada momento, al Dr. Rubén Rangel Salazar por el conocimiento transmitido dentro del laboratorio, a la L.N Julia del Socorro Mora Peña por la obtención de muestras y el acceso a ellas y a la L.N Ivette Aguilera Venegas por todo el apoyo y guía durante el Verano UG. Muchas gracias. Proyecto apoyado por la Convocatoria Institucional de Investigación Científica de la UG 2016-2017, (1089/2016).

REFERENCIAS

[1] Flores, S. & Martínez, H. (2012). Peso al nacer de los niños y niñas derechohabientes del Instituto Mexicano del Seguro Social. *Bol Med Hosp Infant*, 69(1),30-39.

[2] Protocolo Ivette

[3] Boguszewski M. (2011). Latin American Consensus: Children Born Small for Gestational Age. *BMC Pediatrics*. 11,66.

[4] Organización Mundial de la Salud. (2016). Patrones de crecimiento infantil. Recuperado de <http://www.who.int/childgrowth/standards/es/>. 17/07/16,

[5] Wennerström ECM, Simonsen J. & Melbye M. (2015). Long-Term Survival of Individuals Born Small and Large for Gestational Age. *PLoS ONE* 10(9),e0138594.

Simental, L., Castañeda, A., Rodríguez, M. & Guerrero, F. (2012). Birth-weight, insulin levels, and HOMA-IR in newborns at term. *PubMed Commons belowBMC Pediatr*, 12, 94.

[6] Organización Mundial de la Salud. (2015). Biblioteca electrónica de documentación científica sobre medidas nutricionales (eLENA) : Alimentación de lactantes con bajo peso al nacer. Recuperado de http://www.who.int/elena/titles/supplementary_feeding/es/. 18/07/16.

[7] Hendrina, A. & Jane, E. (2006). The developmental origins of adult disease (Barker) hypothesis. *Australian and New Zealand Journal of Obstetrics and Gynaecology*, 46, 4-14.

[8] Holme, A. Roland M., Lorentzen B., Michelsen T., Henriksen T. (2013). Placental glucose transfer: A Human in vivo Study. *PLoS One*.10(2),e0117084.

[9] Andersson E. (2010). Type 2 diabetes risk alleles near *ADCY5*, *CDKAL1* and *HHEXIDE* are associated with reduced birthweight. *Diabetología*, 53, 1908–1916.

[10] Hay WW Jr1. (2006). Placental-fetal glucose exchange and fetal glucose metabolism. *Trans Am Clin Climatol Assoc.*, 117, 321-39.

[11] Kronenberg, H., Melmed, S., Polonsky, K. Reed, P. (2011). *Textbook of Endocrinology* (11ª Ed.). Saunders: Elsevier.

[12] Hattersley, A. & Tooke J. (1999). The fetal insulin hypothesis: an alternative explanation of the association of low birthweight with diabetes and vascular disease. *The Lancet*, 353, 1789-1791.

[13] National Center for Biotechnology Information. (2016). *ADCY5 adenylate cyclase 5 [Homo sapiens (human)]*. Recuperado de <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/111>. 18/07/16

[14] Andersson E. (2010). Type 2 diabetes risk alleles near *ADCY5*, *CDKAL1* and *HHEXIDE* are associated with reduced birthweight. *Diabetología*, 53, 1908–1916.

[15] Sohani, Z.N., Anand, S.S., Robiou-du-Pont S.(2016). Risk Alleles in/near *ADCY5*, *ADRA2A*, *CDKAL1*, *CDKN2A/B*, *GRB10*, and *TCF7L2*, Elevate Plasma Glucose Levels at Birth and in Early Childhood: Results from the FAMILY Study. *Kirchmair, R. PLoS ONE*, 11(4), e0152107.

[16] Wagner R, Dudziak K, Herzberg-Schäfer SA. (2011). Glucose-Raising Genetic Variants in *MADD* and *ADCY5* Impair Conversion of Proinsulin to Insulin. *MuenzbergGruening H, ed. PLoS ONE*.6 (8),e23639.

[17] National Center for Biotechnology Information. (2016). *CDKAL1 CDK5 regulatory subunit associated protein 1 like 1 [Homo sapiens (human)]*. Recuperado de <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/54901>. 18/07/16.

[18] Horikoshi. (2013). New loci associated with birth weight identify genetic links between intrauterine growth and adult height and metabolism. *Nat Genet*, 45(1), 76-82.

[19] Giannini,C.(2014). Co-occurrence of Risk Alleles in or Near Genes Modulating Insulin Secretion Predisposes Obese Youth to Prediabetes. *Diabetes Care*. 37(2), 475-82.

[20] 63 Ivette Gamboa, M., Huerta, A., Moreno, H., Vázquez, P., Ordóñez, M. L., Rodríguez, R. & Luna, M. (2012). Contribution of Common Genetic Variation to the Risk of Type 2 Diabetes in the Mexican Mestizo Population. *Diabetes*, 61(12), 3314–3321.

[21] National Center for Biotechnology Information: dbSNP. (2016). Reference SNP Cluster Report: rs11708067. Recuperado de http://www.ncbi.nlm.nih.gov/SNP/snp_ref.cgi?searchType=ad hoc_se arch&type=rs&rs=rs11708067. 19/07/16.