

GENOTIPIFICACIÓN DEL POLIMORFISMO Q192R EN EL GEN DE LA PARAOXONASA 1

Amaya Chagolla María Fernanda (1), Alegría Torres, Jorge Alejandro (2)

1 [Estudiante de Químico Farmacéutico Biólogo, Universidad de Guanajuato] | Dirección de correo electrónico: [fer_amch@hotmail.com]

2 [Departamento de Farmacia, División de Ciencias Naturales y Exactas, Campus Guanajuato, Universidad de Guanajuato] | Dirección de correo electrónico: [giorgio_alegretto@hotmail.com]

Resumen

La paraoxonasa 1 (PON1), una enzima antioxidante que está asociada principalmente con la lipoproteína de alta densidad plasmática (HDL) y la inhibición de la oxidación de lipoproteínas de baja densidad (LDL). Varias investigaciones han asociado al polimorfismo Q192R de esta enzima como un factor de riesgo para desarrollar el Síndrome Metabólico. En este estudio se genotipificó el polimorfismo Q192R de la PON1 y se relacionó con el IMC de personas adultas. Las frecuencias genotípicas y alélicas se determinaron mediante discriminación alélica por PCR en tiempo real usando sondas fluorogénicas TaqMan. La distribución de la frecuencia alélica fue Q=33.8 y R=66.2 siguiendo un equilibrio Hardy Weinberg ($X^2=0.082$, $p=0.77$). Se obtuvieron frecuencias genotípicas y alélicas comparables con estudios anteriores. En la población analizada, no se observaron diferencias estadísticas significativas en la distribución de los alelos tomando en cuenta las variables: sexo y IMC. Sin embargo, se observó una tendencia de aumento del IMC entre los genotipos QQ, QR y RR, respectivamente.

Abstract

The paraoxonase 1 (PON1) is an antioxidant enzyme that is associated with the plasmatic high-density lipoprotein (HDL) and oxidation inhibition of low-density lipoprotein (LDL). Several investigations has been associated the polymorphism Q192R of this enzyme as a risk factor for the development of the metabolic syndrome. In this study, the polymorphism Q192R of the PON1 was genotyped and related to the BMI of adult persons. Genotypic and allelic frequencies were determined by allelic discrimination assay by realtime PCR using TaqMan fluorogenic probes. The distribution of allele frequency in the population was Q = 33.8 and R = 66.2 following the Hardy Weinberg equilibrium ($X^2 = 0.082$, $p = 0.77$). genotypic and allelic frequencies comparable with previous studies were obtained. Taking the variables: sex and BMI, significant estadistical differences were not observed in the distribution of alleles. Nevertheless, increasing trend of IMC was observed among genotypes QQ, QR and RR, respectively.

Palabras Clave

Síndrome metabólico, Índice de masa corporal, obesidad, PON1

INTRODUCCIÓN

El síndrome metabólico (SM) es un conjunto de factores de riesgo que predispone a desarrollar enfermedad cardiovascular y diabetes mellitus tipo 2 [1] y cerebrovascular por arteriosclerosis que son las principales causas de muerte en México [2]. El SM es una entidad clínica compleja y heterogénea que conjunta factores externos (ambientales, sociales, culturales y económicos) e internos (carga genética). Según la definición de la Organización Mundial de la Salud (OMS) en la población adulta, una persona puede ser diagnosticada con SM si cuenta con más de dos de estos criterios: hipertensión arterial (140/190), hipertrigliceridemia (>150mg/dL) y/o HDL <35mg/dL en hombres o <40 mg/dL en mujeres, microalbuminuria (<20mg/min) y obesidad (índice de masa corporal (IMC) >29.99kg/m²), así como la presencia de Diabetes tipo 2, intolerancia a la glucosa o resistencia a la insulina [3].

En promedio, mientras más grasa, mayor es la posibilidad de que un individuo se vuelva dislipidémico y exprese más elementos del síndrome metabólico [4].

Como ya se mencionó, a partir de un riesgo no modificable, como es la carga genética, la expresión del SM se da por la acumulación de los factores externos a lo largo de la vida de un individuo [2]. La paraoxonasa 1 (PON1), una enzima antioxidante que está asociada principalmente con la lipoproteína de alta densidad plasmática (HDL) y a la capacidad de inhibir la modificación oxidativa de lipoproteínas de baja densidad (LDL). Tras varias investigaciones, se han determinado diferentes polimorfismos tanto en la región promotora como en la zona de codificación, en esta última, autores mencionan dos más comunes: L55M y Q192R. El genotipo Q192R demostró que determina la capacidad catalítica de la enzima [6], al mismo tiempo, esos cambios en su actividad, pueden actuar como un factor de riesgo para una variedad de enfermedades, entre ellas el SM [7].

El Q192R es un polimorfismo de un nucleótido simple (A/G), que da como resultado la sustitución de glutamina por arginina en la posición 12 del gen *PON1* [8]. Son varias las investigaciones que asocian el alelo R con varios riesgos de salud, como en la resistencia a insulina [9], en la enfermedad de las arterias coronarias [8], al aumento en la grasa corporal en niños expuestos a plaguicidas [10], al aumento del doble en el desarrollo de la obesidad de mujeres [11].

Los factores genéticos crean vulnerabilidad a algunas enfermedades, es por eso la necesidad de identificarlos como parte de los riesgos a padecerlas, una de ellas es el SM, que se ha convertido ya en un problema de salud pública nacional e internacionalmente. Se necesita generar conocimiento mediante estrategias científicas, como los mecanismos celulares y moleculares implicados para el diseño de nuevos modelos de atención, así como tratamientos más adecuados [2].

En este trabajo se desarrolló la genotipificación del polimorfismo Q192R del gen *PON1* en personas adultas y se asociaron los genotipos (QQ, QR y RR) con el IMC como un indicador del riesgo a desarrollar SM.

MATERIALES Y MÉTODOS

Grupo de estudio

Personas de 24 a 83 años habitantes del estado de San Luis Potosí fueron seleccionadas de una base de datos previamente obtenidos, así como la obtención de ADN del paquete leucocitario, a los que se les determinó la contribución de su genotipo con el aumento del IMC como indicador de SM.

Cuantificación y análisis de la calidad de ADN

Se tomaron alícuotas de las muestras de ADN extraído (3µL de muestra + 27 µL de agua grado molecular) y se cuantificó el ADN mediante espectroscopia UV por el lector de placas Epoch (BioTek) a 260nm para realizar el ajuste a 30ng/µL, así mismo, se analizó su calidad con la relación de la absorbancia a 260nm y 280nm.

Genotipificación del polimorfismo Q192R

La genotipificación del gen *PON1* se realizó mediante discriminación alélica con PCR en tiempo real. Los polimorfismos fueron detectados por la amplificación de los fragmentos específicos, sumando la hibridación de las sondas específicas con cada alelo mostrando diferente fluorescencia. Las sondas para el alelo silvestre ([Q670]-TCTCCCAGGATTGTAAGTAG- [BHQ2]) y para el alelo mutante ([Q705]-CTCCCAGGATCGTAAGTA-[BHQ2]), así como los Primers (CGACCACGCTAAACCCAAATAC/TGTGGGACCTGAGCACTT) fueron diseñados mediante RealTimeDesign Software por BioSearch Technologies Inc. Para la PCR en tiempo real, cada ensayo se realizó por duplicado, la mezcla de reacción para cada uno contenía 3 μ L de ADN genómico (30 ng/ μ L), 300nM de cada Primer, 200nM de cada sonda, 1 μ L de agua grado molecular y 5 μ L de PCR master mix (Bio-Rad), resultando 10 μ L para cada reacción. Los ciclos realizados de PCR se programaron en CFX96 Touch Real-time PCR detection system (Bio-Rad) y consistieron en un ciclo de incubación (95°C, 3min) y los 45 ciclos de amplificación (92°C, 15 seg y 60°C, 1 min). El genotipo de cada ensayo se detectó mediante el software Bio-Rad CFX Manager versión 2.1, generando tres genotipos diferentes: QQ, QR y RR.

Verificación de la amplificación mediante electroforesis

El fragmento que contenía el polimorfismo Q192R de 94pb, tras la reacción de PCR, fue detectado mediante electroforesis en gel de agarosa al 1% y teñido con bromuro de etidio para su revelado, se realizó por duplicado. Se utilizó el marcador de peso molecular Gene Ruler de 1kb a 100 V y 200mA por 20 min.

Análisis estadístico

Se sometieron los datos obtenidos a la X^2 del equilibrio Hardy-Weinberg para la determinar la diferencia entre lo observado y lo esperado en las frecuencias genotípicas encontradas. Las diferencias genotípicas y los valores de IMC fueron relacionados y analizados mediante el software estadístico SPSS versión 19. Los valores de IMC como variable dependiente del genotipo se analizaron mediante ANOVA tras mostrar que eran normales. Se analizó también la X^2 para comprobar si la distribución de los alelos no se ve influenciada por las variables de sexo y del IMC (normal y sobrepeso/obesidad). El nivel de significancia fue <0.05 . La clasificación del IMC de acuerdo a sus valores se realizó según los criterios de la OMS (rango normal del IMC de 18.4 a 24.99, IMC ≥ 25 para sobrepeso e IMC ≥ 30 para obesidad) [3].

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

La cantidad de genotipos QQ, QR y RR, siguen un equilibrio Hardy-Weinberg ($X^2=0.082$, $p=0.77$) mostrando que la población analizada mantiene sus frecuencias genotípicas constantes. No se encontraron diferencias significativas entre el sexo y la distribución alélica ($p=1.07$); el sexo y la clasificación del IMC ($p=0.11$); ni en la distribución alélica y la clasificación del IMC ($p=0.8141$), indicando que la distribución de los alelos no se ve influenciada por las variables de sexo y del IMC en la población analizada (Tablas 2, 3 y 4).

Aunque se observa una tendencia de aumento (gráfica 1) en las medias del IMC entre los tres genotipos (QQ, QR y RR, respectivamente), el análisis mediante ANOVA del IMC muestra que no hay diferencias de los valores de éste dentro los genotipos analizados ($p=0.463$), indicando que el valor de IMC no se ve modificado por el polimorfismo Q192R. Se han utilizado los valores del IMC ya que es el parámetro más constante como criterio de diagnóstico de la obesidad y del SM [2]. De acuerdo a ello, se ha informado que la LDL oxidada, producto de una deficiencia en la actividad de la *PON1*, puede ser internalizada por el adipocito lo que contribuye a aumentar la masa del tejido adiposo [5] (por lo tanto, aumento del IMC), pero debido a la naturaleza compleja de la obesidad, como dependiente de más factores genéticos y además ambientales [7], hace difícil su relación con un único polimorfismo.

Quizá, un factor importante dentro de los estudios epidemiológicos, sea que el riesgo a una enfermedad deba analizarse tanto el conjunto de variables genotípicas, como el de las variables externas, para una mejor

correlación entre la carga genética y el impacto del ambiente social, cultural, económico, etc., en estudios futuros.

En cuanto a la frecuencia genotípica y alélica, se encontró que el genotipo predominante fue RR con aproximadamente 44%, seguido QR con 43.5% y QQ con 12%. El alelo con mayor frecuencia en la población fue R con el 66.2%, Q presentó un 33.8%. este tipo de frecuencias, donde los porcentajes mayores son del alelo mutante (R), ya se han visto anteriormente en estudios epidemiológicos en poblaciones mexicanas [12,13,14] a diferencia de algunas poblaciones en Europa [10,11,15] (Tabla 5). Además de la observación de que más de la mitad de las personas participantes del estudio tenían sobrepeso/obesidad (aprox. 70%).

Tabla 1. Relación del sexo y la distribución de alelos

Sexo/Alelo	Q	R
F	25	41
M	12	12
p=1.07		

Tabla 2. Relación del sexo y el IMC

Sexo/IMC	Normal	Sobrepeso/O besidad
F	8	23
M	4	9
p=0.11		

Tabla 3. Relación de la distribución de alelos y el IMC

Alelo/IMC	Normal	Sobrepeso/O besidad
Q	10	25
R	14	39
p=0.8241		

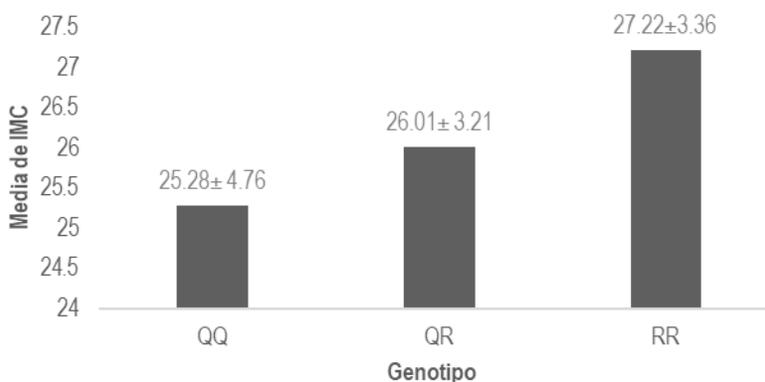
Se obtuvieron frecuencias genotípicas y alélicas comparables con estudios anteriores. En la población analizada, no se observaron diferencias estadísticas significativas en la distribución de los

Tabla 4: Frecuencias alélicas de PON 1 de diferentes poblaciones comparadas con la de este estudio.

Lugar	Q (%)	R (%)	Referencia
San Luis Potosí, Méx.	33.8	66.2	En este estudio
Morelos, Méx.	40	60	López et al., 2009
CDMX	51	49	Rojas et al., 2005
Yucatán, Méx.	44	56	Pérez et al., 2008
Dinamarca	72	28	Tinggaard et al., 2016
Portugal	70	29	Veiga et al., 2010
España	70.8	29.2	Ferré et al., 2013

CONCLUSIONES

Gráfica 1. Media del IMC con relación al genotipo



*p=0.463, obtenido del análisis ANOVA del IMC como variable dependiente del genotipo.

alelos tomando en cuenta las variables: sexo y IMC. Sin embargo, se observó una tendencia de aumento del IMC entre los genotipos QQ, QR y RR, respectivamente.

Se cuenta con información suficiente para relacionar este polimorfismo con otros signos del SM, así como tomar importancia de los factores no modificables debido a la carga genética en el riesgo de padecer esta y otras enfermedades.

REFERENCIAS

- [1] Cerezo, G. H., Vicario, A., Vainstein, N., & Biasin, E. (2008). Características del síndrome metabólico en la consulta cardiológica: Grupo de estudio CARISMA (Caracterización y Análisis del Riesgo en Individuos con Síndrome Metabólico en la Argentina). *Insuficiencia cardíaca*, 3(1), 11-15.
- [2] García-García, E., De la Lata-Romero, M., Kaufer-Horwitz, M., Tusié-Luna, M. T., Calzada-León, R., Vázquez-Velázquez, V., Barquera-Cervera, S., Caballero-Romo, A. de J., Orozco, L., Velásquez-Fernández, D., Rosas-Peralta, M., Barriguete-Meléndez, A., Zacarías-Castillo, R., Sotelo-Morales, J., (2008). La obesidad y el síndrome metabólico como problema de salud pública. Una reflexión. *Acta Pediátrica de México*. 29(4).
- [3] Joint WHO/FAO Expert Consultation on Diet, Nutrition and the Prevention of Chronic Diseases. Geneva: WHO/FAO, 2002. Diet, nutrition and the prevention of chronic diseases: Report of a joint WHO/FAO Expert Consultation, WHO technical report series; 916. Ginebra, 2003. Recuperado de http://whqlibdoc.who.int/trs/WHO_TRS_916.pdf
- [4] Troyo-Barriga, P. (2004). Obesidad y dislipidemias. *Gac. Méd. Méx.*, 140 (2), 49-58.
- [5] Martínez-Salazar, M. F., Almenares-López, D., García-Jiménez, S., Sánchez-Alemán, M. A., Juantorena-Ugás, A., Ríos, C., & Monroy-Noyola, A. (2011) Relationship between the paraoxonase (PON1) L55M and Q192R polymorphisms and obesity in a Mexican population: a pilot study. *Genes & Nutrition*, 6(4),361–368.
- [6] Furlong, C. E., Marsillach, J., Jarvik, G. P., & Costa, L. G. (2016). Paraoxonases-1, -2 and -3: What are their Functions? *Chemico-Biological Interactions*, 259(Pt B), 51–62.
- [7] Rupérez, A., López-Guamido, O., Gil, F., Olza, J., Gil-Campos, M., Leis, R., Tojo, R., Cañete, R., Gil, A., Aguilera, C. M. (2013) Paraoxonase 1 activities and genetic variation in childhood obesity. *Br J Nutr*. 110(9) 39-47.
- [8] Hassan, M. A., Al-Attas, O. S., Hussain, T., Al-Daghri, N.M., Alokail, M.S., Mohammed, A.K., Vinodson, B. The Q192R polymorphism of the paraoxonase 1 gene is a risk factor for coronary artery disease in Saudi subjects. (2013) *Mol Cell Biochem* 380:121–128.
- [9] Alegría-Torres, Jorge Alejandro et al. Q192R Polymorphism of Paraoxonase 1 Gene Associated with Insulin Resistance in Mexican Children. (2014) *Archives of Medical Research*, 46 (1), 78 – 83
- [10] Tinggaard, J., Wohlfahrt-Veje, C., Husby, S., Christiansen, L., Skakkebaek, N. E., Jensen, T. K., Grandjean, P., Main, K.M., Andersen, H.R. Prenatal pesticide exposure and PON1 genotype associated with adolescent body fat distribution evaluated by dual X-ray absorptiometry (DXA). (2016) *Andrology*. 4(4):735-744
- [11] Veiga, L., Silva-Nunes, J., Melão, A., Oliveira, A., Duarte, L., Brito, M. (2010). Q192R polymorphism of the paraoxonase-1 gene as a risk factor for obesity in Portuguese women. *Eur J Endocrinol* 164(2) 213-218
- [12] López-Flores, I., Lacasaña, M., Blanco-Muñoz, J., Aguilar-Garduño, C., Sanchez-Villegas, P., Pérez-Méndez, O. A., Gamboa-Avila, R. (2009) Relationship between human paraoxonase 1 activity and PON1 polymorphisms in Mexican workers exposed to organophosphate pesticides. *188(2):8 4-90*
- [13] Rojas-García, A. E., Solís-Heredia, M.J., Piña-Guzmán, B., Vega, L., López-Carrillo, L., Quintanilla-Vega, B. (2005) Genetic polymorphisms and activity of PON1 in a Mexican population. *Toxicol Appl Pharmacol*. 205(3):282-9
- [14] Pérez-Herrera, N., May-Pech, C., Hernández-Ochoa, I., Castro-Mañé, J., Rojas-García, E., Borja-Aburto, V. H., Castillo-Burguete, T., Quintanilla Vega, B. (2008) PON1 Q192R polymorphism is associated with lipid profile in Mexican men with Mayan ascendancy. *Exp Mol Pathol*. 85(2):129-34
- [15] Ferré, N., Feliu, A., García-Heredia, A., Marsillach, J., París, N., Zaragoza-Jordana, M., Mackness, B., Mackness, M., Escibano, J., Closa-Monasterolo, R., Joven, J., Camps, J. Impaired paraoxonase-1 status in obese children. Relationships with insulin resistance and metabolic syndrome. (2013). *Clin Biochem*. 46(18):1830-1836.