

# GENOTIPIFICACIÓN DEL POLIMORFISMO M287T EN EL GEN *AS3MT* EN NIÑOS DE SALAMANCA, GUANAJUATO

López Romero, Rafael (1), Alegría Torres, Jorge Alejandro (2)

1 [Químico Farmacéutico Biólogo, Universidad de Guanajuato] [ r.lopez.romero@ugto.mx ]

2 [Departamento de Farmacia, División de Ciencias Naturales y Exactas, Campus Guanajuato, Universidad de Guanajuato] [webugto@ugto.mx]

## Resumen

El arsénico, está presente de forma natural en niveles altos en las aguas subterráneas de varios países. La exposición crónica al arsénico se ha asociado con el desarrollo de enfermedades cancerosas y no cancerosas. Al metabolizarse el cuerpo utiliza la enzima arsénico (III) metiltransferasa (*AS3MT*) como la principal enzima catalítica. Las variaciones genéticas del gen que codifica para la *AS3MT* se han asociado con la eficiencia de metilación del arsénico. El polimorfismo más común, es el denominado, M287T, en el cual hay un cambio en la posición 287 de la proteína *AS3MT* de un a metionina por una treonina, asociado con una menor capacidad de metilación. En este estudio se realizó la genotipificación del polimorfismo M287T de la *AS3MT* en un grupo de 46 niños de Salamanca, Gto, mediante discriminación alélica por qPCR utilizando sondas taqman. Las frecuencias alélicas observadas fueron T=79.1% y C=20.9% mientras que las frecuencias genotípicas fueron TT=76.7%, TC=11.7% y CC=11.7%. El grupo de estudio no se encontró en equilibrio HW ( $X^2=21.31$ ;  $P<0.001$ ). Al realizar un análisis estadístico no se observaron diferencias en el arsénico urinario ni por sexo ni por el alelo del individuo. Ya que en el grupo de estudio no se observaron diferencias en los niveles de arsénico urinario tomando en cuenta el genotipo (valor de referencia 35  $\mu\text{g/L}$  de As en orina, NOM-047-SSA1-2011), debe ampliarse el tamaño de muestra y considerar cuantificar las especies químicas de arsénico para estudios futuros.

## Abstract

Arsenic, is naturally present in high levels in groundwater in several countries. Chronic exposure to arsenic has been associated with the development of cancerous and non cancerous diseases. When metabolizing it, the body uses enzyme arsenic (III) methyltransferase (*AS3MT*) as the main catalytic enzyme. Genetic variations of gene that is encode to *AS3MT*, has been associated with the efficiency of arsenic methylation. The most common polymorphism is called, M287T, there is a change in the position 287 of the protein, a methionine for threonine, associated with a lower capacity for methylation. In this study the genotyping of the M287T polymorphism of the *AS3MT* was performed in a group of 46 children from Salamanca, Gto, for allelic discrimination by qPCR, using TaqMan probes. The observed allelic frequencies were T = 79.1% and C = 20.9% while the genotypic frequencies were TT = 76.7%, TC = 11.7% and CC = 11.7%. The study group was not found in HW equilibrium ( $X^2=21.31$ ;  $P<0.001$ ). After to do statistic analysis, no differences were observed in urinary arsenic by sex neither allele of the subject. Although the study group were not observed differences in levels of urinary arsenic considering the genotype (reference value 35  $\mu\text{g/L}$  of As in urine NOM-047-SSA1-2011), the sample siza should be increased and quantify the chemical species of arsenic for future studies.

## Palabras Clave

Arsénico; Exposición infantil; *AS3MT*; Polimorfismos en M287T

## INTRODUCCIÓN

El arsénico es un metaloide tóxico, es el vigésimo elemento más abundante en la corteza terrestre, [1] está presente de forma natural en niveles altos en las aguas subterráneas de varios países, entre ellos Argentina, Bangladesh, Chile, China, la India, México y los Estados Unidos de América [2] El recurso hídrico contaminado con arsénico se utiliza para cultivar alimentos y como agua potable, causando un peligro para la salud en todo el mundo afectando a decenas de millones de personas. [1] La exposición crónica al arsénico ingerido en el agua contaminada se ha asociado con el desarrollo de enfermedades cancerosas y no cancerosas incluyendo cáncer de piel, diabetes, neuropatía y enfermedades cardiovasculares. [3]

El arsénico en el medio ambiente se encuentra comúnmente en su forma inorgánica, como arsenato (As (V)) o arsenito (As (III)). El metabolismo del arsénico crea metabolitos que son excretados en la orina y tienen diferentes grados de toxicidad. Utilizando la enzima arsénico (III) metiltransferasa como la principal enzima catalítica, el arsenito (As (III)) se metila primero a ácido monometilarsónico (MAs (V)) y luego se reduce a ácido monometilarsinoso (MAs (III)) que luego sigue un segundo paso de metilación y reducción para crear ácido dimetilarsínico (DMAs (V)) y ácido dimetilarsinoso (DMAs (III)) respectivamente. [3] Del mismo modo, las variaciones genéticas en los genes implicados en el metabolismo del arsénico también se han asociado con la eficiencia de metilación del arsénico. [1, 4]

La distribución más frecuente de metabolitos de arsénico en la orina humana es 10-30% de As, 10-20% de MAs y 60-70% de DMAs, pero hay grandes variaciones individuales. Algunas variaciones están asociadas con polimorfismos de un solo nucleótido (SNP) en el gen *AS3MT*. Los polimorfismos en el gen *AS3MT* se han asociado con patrones alterados de metabolitos de arsénico entre diferentes poblaciones, incluidas las de Bangladesh, Argentina, México, Taiwán y Europa Central. Estas variantes están asociadas con un metabolismo de arsénico más eficiente y sugieren una adaptación humana a los niveles altos y persistentes de arsénico [1] aunque también hay estudios que demuestran que los polimorfismos disminuyen la capacidad de metilación de la enzima *AS3MT* [5]

El polimorfismo más común, es el denominado, M287T, en el cual hay un cambio en la posición 287 de la proteína *AS3MT* de un a metionina por una treonina. [6] Este polimorfismo se ha asociado con una menor capacidad de metilación general, con menores índices de metilación urinaria primaria (MAs / iAs) y secundaria (DMAs / MAs) en diferentes poblaciones [1]

En este estudio se realizó la genotipificación del polimorfismo M287T de la *AS3MT* en un grupo de 46 niños de Salamanca, Guanajuato, expuestos a arsénico en el agua potable, para observar si existía relación entre el genotipo de cada individuo y la excreción de arsénico urinario ( $\mu\text{g/L}$ ). La genotipificación se realizó mediante discriminación alélica por qPCR utilizando sondas taqman.

## MATERIALES Y MÉTODOS

### Grupo de estudio

Se analizaron 46 muestras de ADN que fueron obtenidas de niños de entre 7-12 años del municipio de Salamanca, Guanajuato.

### Extracción de ADN

Se realizó la extracción de ADN a partir de sangre obtenida por punción venosa a la cual se le dio el siguiente tratamiento, a 1 mL de sangre se le agregaron 2 mL de buffer de lisis (Sacarosa 10%,  $\text{MgCl}_2$  10% y Tris-HCl

10%), seguido de hacer vórtex (10 segundos). Después de centrifugar (3000rpm, 5 minutos) y se desecho el sobrenadante, esto se repitió cuatro veces para cada muestra, seguido de esto, se agregó 1 mL de Tris-HCl pH8 y se pasó a un tubo de 1.5mL y se agregó detergente doméstico foca al 2% y se mezcló, para después agregar NaCl y así precipitar las proteínas y retirar el sobrenadante después de centrifugar; el sobrenadante se pasó a un tubo previamente etiquetado con 1 mL de alcohol isopropílico y se congeló para su posterior uso.

### Cuantificación de ADN

La cuantificación de ADN se realizó mediante espectroscopía UV haciendo una dilución 1:10 de la muestra obtenida de ADN en agua grado biología molecular, colocando 3  $\mu$ L de muestra (antes de tomar el volumen de muestra se agitó en vórtex por 5-10 segundos para re suspender el ADN precipitado) y 27  $\mu$ L de agua. Posteriormente se utilizó una placa de 384 pozos en la cual se depositaron los 30  $\mu$ L de la dilución, incluyendo un blanco de agua. La placa se leyó en un espectrofotómetro EPOCH (BioTek) a 260nm y 280nm (para cuantificar ADN y proteínas respectivamente), y los datos se obtuvieron con el software Gen5, los cuales fueron transferidos a una hoja de cálculo de Excel para realizar las operaciones correspondientes y obtener la relación de ADN/proteínas, y el volumen de muestra y agua requerido para llevar todas las muestras a una concentración final de ADN de 30ng/ $\mu$ L.

### Genotipificación del polimorfismo M287T

La genotipificación del polimorfismo M287T en el gen *AS3MT* se llevó a cabo por discriminación alélica en PCR en tiempo real, se utilizaron sondas específicas para la hibridación con la secuencia amplificada que contenía la base complementaria al polimorfismo y así poder diferenciarlas por fluorescencia, para el alelo silvestre la secuencia fue: 5' d CAL Fluor Orange 560-TTGGCATCAAACATTAGTTC-BHQ-1 3' y para el alelo mutante fue: 5' d CAL Fluor Red 610- ATTGGCATCAAACGTTAGTTC-BHQ-2 3', los oligonucleótidos iniciadores utilizados fueron oligo directo AGGGCAAGAGCAGAAAGAATACCA y oligo reverso CACTCTAAGACAGACCAACCAA, diseñados con RealTimeDesign Software por BioSearch Technologies Inc.

En la reacción de PCR cada una de las muestras se analizó por duplicado, se preparó una mezcla de reacción el cual contenía 300 nmol de cada uno de los oligos, y 200 nmol de cada sonda, 5  $\mu$ L de PCR master mix (Bio-Rad), y 1  $\mu$ L de agua grado biología molecular. Se utilizó un termociclador con sistema de detección para PCR tiempo real modelo CFX96 Touch de Bio-Rad, con las siguientes condiciones, una incubación inicial de 2 min a 50°C y 39 ciclos de amplificación de 10 min a 95°C, 15 seg a 95°C y 1 min 56°C. Para obtener el genotipo de cada muestra se utilizó el software Bio-Rad CFX Manager versión 2.1 el cual arrojó tres resultados de genotipos diferentes: TT, TC y CC.

### Electroforesis

Se hizo una electroforesis para verificar que hubo amplificación del fragmento de interés (152pb) en gel de agarosa al 1% teñido con bromuro de etidio para su posterior revelado con las siguientes condiciones para la electroforesis 100V 200mA durante 20 min. Se utilizó el marcador de peso molecular Gene Ruler de 1Kb y se cargaron 3  $\mu$ L en el gel, así como 13  $\mu$ L de muestra por duplicado.

### Análisis estadístico

Se analizaron los genotipos obtenidos considerando el, sexo y los valores de arsénico excretado en la orina  $\mu$ L (El valor de referencia de arsénico en orina se tomó de la NOM-047-SSA1-2011 y fue de 35  $\mu$ g/L). El nivel de significancia usado fue <0.05. Asimismo, se determinó el equilibrio Hardy-Weinberg.

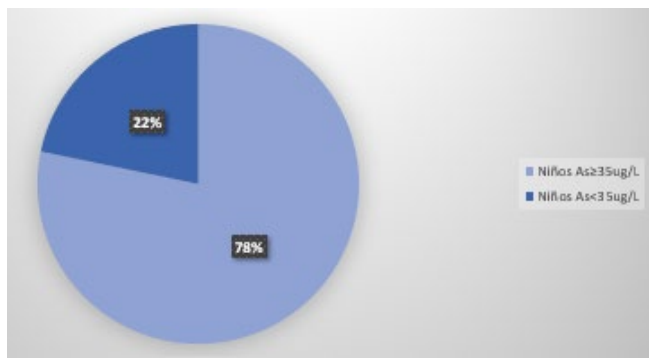
## RESULTADOS Y DISCUSIÓN

El 78% de la población de estudio sobrepasó el valor de referencia de la NOM-047-SSA1-2011 (Gráfico 1), [7] sobre pasa el límite de arsénico urinario ( $\mu\text{g/L}$ ), esto quiere decir que las personas del municipio de Salamanca están expuestas a grandes cantidades de arsénico en el agua que consumen.

Las frecuencias alélicas y genotípicas fueron  $T=79.1\%$  y  $C=20.9\%$  así como  $TT=76.7\%$ ,  $TC=11.7\%$  y  $CC=11.7\%$  respectivamente, sin observarse equilibrio Hardy-Weinberg ( $X^2=21.31$ ;  $p<0.001$ ) (Tabla 1).

No se encontraron diferencias significativas entre la excreción de arsénico urinario y el sexo de los participantes ( $p=0.8764$ ); los niveles de arsénico tampoco fueron diferentes por genotipo ( $p=0.3270$ ). (Tablas 2 y 3)

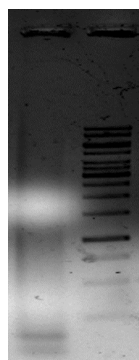
Para verificar que hubo amplificación en la PCR, se hizo una electroforesis (Imagen 1) donde se observó una banda del fragmento (152pb) que contiene el polimorfismo M287T.



**GRÁFICO 1:** Porcentaje de la población que sobre pasa el valor de referencia de  $35 \mu\text{g/L}$  NOM-047-SSA1-2011.

**Tabla 1.** Frecuencias alélicas y genotípicas obtenidas.

Población		Frecuencias alélicas		Frecuencias genotípicas	
	%T	%C	%TT	%TC	%CC
Niños de Salamanca, Gto.	79.1	20.9	76.6	11.7	11.7



**IMÁGEN 1:** Electroforesis del fragmento del gen *AS3MT* que contiene el polimorfismo M287T, (izquierda, fragmento amplificado, 152pb; derecha, marcador de peso molecular, 1Kb donde la última banda es de 250 pb)

**Tabla 2.** Distribución de frecuencia del sexo y los niveles de arsénico urinario.

Sexo/As( $\mu\text{g/L}$ )	As $\geq 35 \mu\text{g/L}$	As $< 35 \mu\text{g/L}$
H	17	5
M	19	5
$p=0.8764$		

**Tabla 3.** Distribución de frecuencias alélicas y el arsénico urinario.

Alelo/As( $\mu\text{g/L}$ )	As $\geq 35 \mu\text{g/L}$	As $< 35 \mu\text{g/L}$
T	32	9
C	7	4
$p=0.3270$		

## CONCLUSIONES

A pesar de que este estudio se realizó en un grupo pequeño de participantes (n=46), se pudo detectar una exposición a arsénico por los niveles de este metaloide en orina, superando el 78% el valor de referencia de 35 µg/L (NOM-047-SSA1-2011). Por la misma razón del tamaño tan pequeño de muestra, el grupo de estudio no se encontró en equilibrio HW. Sin embargo, las frecuencias observadas en este estudio difirieron de otro estudio realizado en Zimapan, Hidalgo T= 93.1%, y C= 6.9%.

## REFERENCIAS

- [1] Li Jiaojiao., Packianathan, Charles., Rossman, Toby G., Rosen, Barry P. (2017). Nonsynonymous Polymorphisms in the Human AS3MT Arsenic Methylation Gene: Implications for Arsenic Toxicity. *Chemical Research in Toxicology*, 30, 1481-1491. doi: 10.1021/acs.chemrestox.7b00113.
- [2] www.who.int, consultado el 24 de Julio de 2018, recuperado de: [http://www.who.int/bulletin/online\\_first/11-101253.pdf](http://www.who.int/bulletin/online_first/11-101253.pdf)
- [3] Gomez Rubio, Paulina., Klimentidis, Yann C., Cantu Soto, Ernesto., Meza Montenegro, Maria M., Billheimer, Dean., Lu, Zhenqiang., Chen, Zhao., Klimecki, Walter T. (2012). Indigenous American ancestry is associated with arsenic methylation efficiency in an admixed population of northwest Mexico. *J Toxicol Environ Health A.*, 75(1), 36-49. doi: 10.1080/15287394.2011.615107.
- [4] Drobná, Zuzana., Del Razo, Luz M., Gracia Vargas, Gonzalo G., Sánchez Peña, Luz C., Barrera Hernández, Angel., Stýblo, Miroslav., Loomis, Dana. (2013). Environmental exposure to arsenic, AS3MT polymorphism and prevalence of diabetes in Mexico. *J Expo Sci Environ Epidemiol*, 23(2), 151-155. doi: 10.1038/jes.2012.103.
- [5] Fatemeh, Farhid., Fatemeh, Nadali., Ardeshir, Ghavamzadeh., (2017). Frequency of M287T/AS3MT Single Nucleotide Polymorphism in an Iranian Population. *International Journal of Hematology-Oncology and Stem Cell Research*, 11, 19-23. doi: ijhoscr.tums.ac.ir
- [6] Ding, Lan., Saunders, Jesse., Drobná, Zuzana., Walton, Felecia S., Xun, Pencheng., Thomas, David J., Stýblo, Miroslav. (2012). Methylation of Arsenic by Recombinant Human Wild-Type Arsenic (+3 Oxidation State) Methyltransferase and its Methionine 287 Threonine (M287T) Polymorph: Role of Glutathione. *Toxicol Appl Pharmacol*, 264(1), 121-130. doi: 10.1016/j.taap.2012.07.024.
- [7] www.dof.gob.mx, consultado el 24 de Julio de 2018, recuperado de: [http://diariooficial.gob.mx/nota\\_detalle.php?codigo=5249877&fecha=06/06/2012](http://diariooficial.gob.mx/nota_detalle.php?codigo=5249877&fecha=06/06/2012)