



CIRUGÍA y CIRUJANOS

Órgano de difusión científica de la Academia Mexicana de Cirugía
Fundada en 1933

www.amc.org.mx www.elsevier.es/circir



ARTÍCULO ORIGINAL

Alta frecuencia del alelo ancestral del polimorfismo rs2291166 de *TJP1* en población mexicana, efecto conformacional así como las aplicaciones en cirugía y medicina



Sergio Alberto Ramirez-García^a, Luis Javier Flores-Alvarado^b,
Luz Rosalba Topete-González^c, Claudia Charles-Niño^d, Manuel Mazariegos-Rubi^e
y Nory Omayra Dávalos-Rodríguez^{e,*}, Grupo Multidisciplinario para el Estudio Integral
de las Enfermedades Metabólicas e Infecciosas en población Mexicana

^a Universidad de la Sierra Sur, Instituto de Investigaciones sobre la Salud Pública, Sistema de Universidades Estatales de Oaxaca (SUNEO), Miahuatlán de Porfirio Díaz, Oaxaca, México

^b Programa de Doctorado en Genética Humana, Benemérita Universidad de Guadalajara, México

^c Laboratorio de Patología Clínica, Hospital Regional Valentín Gómez Farías, Instituto de Seguridad y Servicios Sociales de los trabajadores del Estado, Guadalajara, Jalisco, México

^d Departamento de Microbiología y Patología, Centro Universitario de Ciencias de la Salud, Benemérita Universidad de Guadalajara, Guadalajara, Jalisco, México

^e Laboratorio de Variación Genética y Enfermedad del Instituto de Genética Humana, Departamento de Biología Molecular y Genómica, Centro Universitario de Ciencias de la Salud (CUCS), Benemérita Universidad de Guadalajara, Jalisco, México

Recibido el 18 de noviembre de 2014; aceptado el 2 de junio de 2015

Disponible en Internet el 8 de agosto de 2015

PALABRAS CLAVE

Gen *TJP1*;
Uniones estrechas;
Polaridad celular;
Tráfico celular

Resumen

Antecedentes: El gen *TJP1* codifica para una proteína ZO-1, necesaria para el reclutamiento de las ocludinas y claudinas en las uniones estrechas y participa en la polarización celular. Tiene diferentes variaciones cuya frecuencia ha sido estudiada en numerosas poblaciones; sin embargo en México no hay estudios de este gen, siendo necesarios ya que sus polimorfismos pueden ser usados en estudios de asociación en medicina y en cirugía. Por tal motivo el objetivo de este estudio fue estimar la frecuencia de alelos y genotipos del polimorfismo rs2291166 del gen *TJP1* en población mestiza de México; así como estimar el efecto conformacional del cambio de un aminoácido.

* Autor para correspondencia. Instituto de Genética Humana, Dr. Enrique Corona Rivera, Programa de Doctorado en Genética Humana. Centro Universitario de Ciencias de la Salud, Benemérita Universidad de Guadalajara, México. Sierra Mojada 950, edificio Q, Segundo nivel, Col.: Lomas de Independencia, Apartado Postal. 72340. Guadalajara, Jalisco, México. Tel.: +01(33) 1058-5200, Ext.: 3646.

Correo electrónico: sergio7genetica@hotmail.com (N.O. Dávalos-Rodríguez).

Material y métodos: Se incluyeron 473 individuos. El polimorfismo rs2291166 se identificó por PCR-PASA y PAGE al 7% teñida con nitrato de plata. El efecto conformacional de cambio de aminoácido se realizó *in silico* con los servidores ProtPraram Tool y Search Database with Fasta. **Resultados:** El alelo más frecuente en las dos poblaciones es el alelo ancestral (T). Se encontró una distribución similar a otras poblaciones respecto a los genotipos. El polimorfismo está en equilibrio de Hardy-Weinberg, $p > 0.05$. El cambio de aspartato por alanina produce un cambio conformacional.

Conclusiones: El estudio revela alta frecuencia del alelo ancestral en población mexicana del polimorfismo rs2291166 y produce un cambio en la estructura de ZO-1.

© 2015 Academia Mexicana de Cirugía A.C. Publicado por Masson Doyma México S.A. Este es un artículo Open Access bajo la licencia CC BY-NC-ND (<http://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0/>).

KEYWORDS

Gen TJP1;
Tight junctions;
Cell polarity;
Cell traffic

High frequency of ancestral allele of the *TJP1* polymorphism rs2291166 in Mexican population, conformational effect and applications in surgery and medicine

Abstract

Background: *TJP1* gene encodes a ZO-1 protein that is required for the recruitment of occludins and claudins in tight junction, and is involved in cell polarisation. It has different variations, the frequency of which has been studied in different populations. In Mexico there are no studies of this gene. These are required because their polymorphisms can be used in studies associated with medicine and surgery. Therefore, the aim of this study was to estimate the frequency of alleles and genotypes of rs2291166 gene polymorphism *TJP1* in Mexico Mestizos population, and to estimate the conformational effect of an amino acid change.

Material and methods: A total of 473 individuals were included. The rs2291166 polymorphism was identified PASA PCR-7% PAGE, and stained with silver nitrate. The conformational effect of amino acid change was performed *in silico*, and was carried out with servers ProtPraram Tool and Search Database with Fasta.

Results: The most frequent allele in the two populations is the ancestral allele (T). A genotype distribution similar to other populations was found. The polymorphism is in Hardy-Weinberg, $p > 0.05$. Changing aspartate to alanine produced a conformational change.

Conclusions: The study reveals a high frequency of the ancestral allele at rs2291166 polymorphism in the Mexican population.

© 2015 Academia Mexicana de Cirugía A.C. Published by Masson Doyma México S.A. This is an open access article under the CC BY-NC-ND license (<http://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0/>).

Antecedentes

En la era posgenómica tres paradigmas son de interés en la cirugía general, la realización de procedimientos quirúrgicos personalizados, predicción; así como prevención de complicaciones pre-, inter- y posquirúrgicas¹⁻³. En la población mexicana hay pocos estudios en los genes, y estos se han enfocado al proceso de la fibrogenesis, el caso de polimorfismos en los genes *TGF-β*, *PAI-1*, *AT*, que se asocian con la contractura capsular mamaria posmamoplastia o de respuesta al tratamiento del pirfenidone⁴⁻⁶. Recientemente se ha propuesto como marcador en la clínica quirúrgica al polimorfismo rs1345365 de *ELMO1*⁷.

Además de estos genes, se requieren buscar nuevos marcadores, que puedan ser utilizados en enfermedades cotidianas del cirujano oncólogo, urólogo, ginecólogo, internista y del gastroenterólogo; como son: la pancreatitis aguda, pancreatitis crónica, mola hidatiforme; así como varios tipos de cáncer (tiroides, páncreas, vías biliares, hígado y colon). Por lo cual se propone a las variantes en el gen *TJP1* (Tight Junction Protein-1) como indicadores

en la práctica personalizada de estas. Esto por dos razones: *primero*, que el gen *TJP1* codifica para la proteína ZO-1 (Zona Occludens-1), que forma parte de las uniones estrechas o contactos célula-célula, porque participa en la diferenciación celular, citocinesis y quimiotaxis⁸⁻¹². *Segundo*, porque se ha reportado alteración en la arquitectura de ZO-1 en modelos animales, en estudios *in vivo* y cultivos de tejido, en dos grupos: ya sea por disminución de la expresión de la proteína y, otro por incremento; para el primer caso, corresponde a embarazos molares parciales, mola hidatiforme completa, colangiocarcinomas intrahepáticos como en extrahepáticos, tumores de la vesícula biliar, tumores de mama en estadio 4TLM¹²⁻¹⁶. En el segundo grupo, está el adenocarcinoma ductal pancreático, estadio I-II de cáncer colónico y carcinomas de colon con metástasis al hígado¹⁷⁻²². Recientemente se ha reportado el incremento de TJP1 en el 71% de los casos con neoplasias gastrointestinales, donde la expresión es proporcional al diámetro del tumor, el grado histológico, y la supervivencia de los pacientes²²; por ejemplo, en el cáncer pulmonar de células no pequeñas, la expresión de este

gen es un indicador de buen pronóstico, acorde a la escala TNM²³.

Las evidencias sugieren que en cirugía, los marcadores genéticos ideales de *TJP1* son aquellos que conducen a cambios de aminoácido, porque modifican la estructura de las proteínas con reducción o ganancia de su función, también por acúmulo de estas. En ambos casos se produce enfermedad por alteración estructural²⁴. También aquellos *loci* en sitios crípticos intrónicos, en regiones promotoras o potenciadoras, porque aumentan o disminuyen la expresión génica y por lo tanto, de la proteína.

Los estudios del gen *TJP1* son limitados a nivel mundial, solo hay cuatro polimorfismos con *locus* en regiones intrónicas estudiados en los fenotipos del espectro autista, respuesta al tratamiento de los antipsicóticos y, keratocono²⁵⁻²⁷. Por otra parte, de 155 polimorfismos de la clase SNP (Single Nucleotide Polymorphism, polimorfismo de cambio de un solo nucleótido) y tres DIV (Deletion, Insertion, Variación, variación del tipo deleción/inserción) registrados, que conducen a cambios de aminoácido, solamente seis han sido analizados en población mexicanoamericana, de ellos, la variante rs2291166 está asociada con albuminuria. Este polimorfismo consiste en una transversión T > G en el exón 23, codón 1334, que conduce al cambio de aspartato por alanina en un dominio aún no caracterizado funcionalmente en ZO-1. En población mexicana no hay reportes previos de estos, por lo que se vuelve un reto su estudio, ya que la estructura de la variación genética de los grupos étnicos, constituye una contribución significativa a este tema; por lo que es necesario como un paso previo a un estudio de asociación, para determinar si un polimorfismo está presente y pueda ser validado, como marcador en la clínica-quirúrgica.

Objetivos

Analizar la frecuencia de alelos y genotipos, así como establecer el equilibrio Hardy Weinberg en la población mestiza mexicana, con respecto al polimorfismo rs2291166 (p.D1334A) con *locus* g.29716773T>G del gen *TJP1*. Por otra parte, comparar las frecuencias obtenidas con otras poblaciones y establecer mediante el análisis *in silico*, si el polimorfismo rs2291166 conducía a un cambio conformacional en la proteína ZO-1.

Material y métodos

a) Captación probandos. El trabajo fue un estudio descriptivo, en el cual se incluyeron 473 probandos sanos (n=946 cromosomas), con una edad oscilante entre los 18-82 años, los cuales correspondían a casos con una ancestría mestiza (nacido en México, con un apellido de origen español y ancestros de origen mexicano, tres generaciones hacia atrás). Fueron captados del centro Desarrollo Integral de la Familia (DIF) municipal Chapala Jalisco, de los Laboratorios Tolsa, del Hospital Regional Valentín Gómez Farías, de la Delegación Sur en el Estado de Oaxaca, de la Sociedad de Gerontogeriatría del Estado de Jalisco A. C. (SOGJAL), del Instituto de Investigaciones sobre la Salud Pública de la Universidad de la Sierra Sur, del Instituto de Genética Humana, Centro Universitario de Ciencias de la Salud (CUCS) de la Benemérita Universidad de Guadalajara.

Todos los participantes firmaron la carta de consentimiento informado.

Este trabajo forma parte del proyecto intitulado: «Estudio de tamizaje poblacional para la identificación de factores de riesgo ambientales y genéticos, asociados al desarrollo de enfermedades complejas relacionadas con la nutrición en el occidente así como sur de México», con números de registro IBM/DIF/2010-2012 y IISSP/BAMM/03, aprobado por los Comités de Investigación, Ética y Bioseguridad. Fue realizado acorde a la Declaración de Helsinki y a los principios del tratado de Belmont.

b) Estudio molecular. Se obtuvieron cinco mililitros de sangre periférica de cada probando, en un tubo con ácido Etilendiaminotetraacético (EDTA), que fue utilizado para aislar el DNA mediante un kit comercial (GeneCatcher, Invitrogen). La detección del polimorfismo rs2291166 fue mediante la reacción en cadena de la polimerasa alelo específico (PCR-PASA). Para lo cual se diseñaron los iniciadores: FW1G 5'-CTTCATCTTCTTCAGGTT-3; FW2A 5'-ATATTCTTCATCTTCTTC AGG TG-3, RW3 5'-GTCA-TTCATTATCTGTTAGG-3(Genosys Sigma-Aldrich). El programa



Figura 1 Electroforesis en poliacrilamida al 7%, TBE 0.5X, del PCR-PASA para el SNP rs2291166 de *TJP1*. En el carril número 4 corresponde al corrimiento del marcador de 10 bases (life-tecnologies). El carril 1 y 3 corresponden a muestras de probandos homocigotos T y G, el carril 2 corresponde a un heterocigoto. Bp: pares de bases.

de amplificación realizado en el termociclador TECHNE modelo TC-412, consistió en 30 ciclos: 95 °C, durante 5 minutos (desnaturalización inicial), a 95 °C, por 30 segundos (desnaturalización), 48 °C, 45 segundos (hibridación), a 72 °C, 30 segundos (polimerización), con una extensión final de 72 °C, 5 minutos. La mezcla de reacción; Buffer KCl 2.5 µl (1X), MgCl₂ 1.5 µl (25 mM), 0.5 µl de dNTP's (0.2 mM), 0.5 µl de cada iniciador (25 pmoles), 2 µl de templado de ADN (200 ng), DNA Pol Taq 0.3 µl (3 U/ul) (Invitrogen), y finalmente 17.20 µl de agua, reacción final 25 ml. Los productos de PCR se analizaron mediante electroforesis en poliacrilamida en la proporción 19:1 al 7%, con ulterior corrimiento electroforético con buffer TBE 1X por 1.5 horas a 200 volts, 80-84 mA. Los productos se diferenciaron por los tamaños; el de 102 pb corresponde al alelo T, mientras que el de 107 pb corresponde al alelo G, como se observa en la figura 1.

c) **Análisis conformacional.** Para determinar si el polimorfismo rs2291166 conducía a un cambio conformacional, se analizó la estructura primaria y secundaria de la proteína ZO-1 realizada mediante escaneo en los siguientes software; ProtParam Tool disponible en la página <http://web.expasy.org/protparam>, así como Search Database with Fasta con acceso en la página <http://Fasta.bioch.virginia.edu/fasta.www2/>, considerando los siguientes parámetros: estructura secundaria (Hydropathy/Secondary-Structure/Garnier plot para 4 estados); α -hélices, hojas- β , vueltas y colas). En ambos casos se introdujo en el portal respectivo la secuencia FASTA con número de referencia NCBI > gi|666335569|ref|NP_001287954.1[*Homo sapiens*], en dos versiones; una con el residuo aspartato1334 y la otra con alanina 1334.

d) **Análisis estadístico.** Se estableció la tasa del alelo menor (MAF, Minor Allele Frequency) por conteo directo. Para validar las diferencias en la distribución de alelos y genotipos con base en las frecuencias observadas con las esperadas, se utilizó la χ^2 . Se consideró en equilibrio Hardy Weinberg si la suma de los valores de χ^2 eran menores de 9.21 y $p < 0.001$ con un grado de libertad.

Resultados

En relación a la distribución de alelos del polimorfismo rs2291166 del gen *TJP1*, la frecuencia relativa (fr) en la población mexicana mestiza total analizada fue la siguiente: 0.978 (n=925) para el alelo ancestral o silvestre T y 0.022 (n=21) para el alelo G (fig. 2). La tasa MAF fue G = 0.022/21. La distribución de genotipos la siguiente: 0.958 para los homocigotos T (n=453), 0.0401 para los heterocigotos (n=19) y 0.0021 para los homocigotos G (n=1), como se observa en la figura 2. El índice de heterocigocidad promedio en la población total analizada fue de 0.05 y el de homocigocidad de 0.95. Los homocigotos G fueron escasos en la población analizada. Al comparar las frecuencias relativas de alelos y genotipos rs2291166 con las otras poblaciones reportadas en el banco de SNP, encontramos una distribución similar para los diferentes grupos étnicos, en las cuales el genotipo homocigoto G es poco frecuente, este solo se ha descrito en población Maasai en Kenia (fr = 0.021) y en población aparentemente sana de la colección

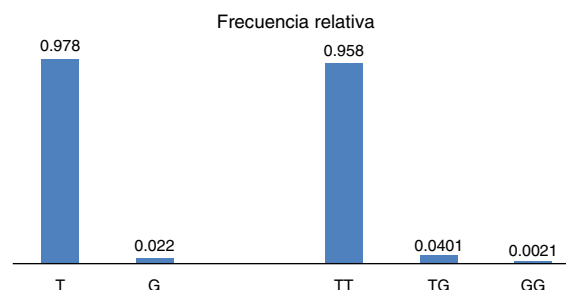


Figura 2 Frecuencia de alelos y genotipos del polimorfismo rs2291166 de *TJP1* en México.

AGI-ASP (Coriel Apparently Healthy Collection) (fr = 0.029) (tabla 1).

Al analizar la distribución de las frecuencias relativas observadas, así como al compararlas con las esperadas, se encontró un valor de χ^2 de 2.3, respectivamente para la población total analizada, y con un valor de $p > 0.05$; por lo tanto, el polimorfismo rs2291166 del gen *TJP1*, está en equilibrio Hardy Weinberg, como se observa en la figura 3, que es muy similar a lo reportado en otras poblaciones (tabla 1).

El estudio *in silico* de la estructura primaria muestra diferencias entre las variantes g.29716773T (p.D1334) y g.29716773G (p.A1334) para el peso molecular, punto isoelectrico, índice de estabilidad, índice alifático, índice de hidrofobicidad, número de residuos con carga positiva, porcentaje de aspartato; así como en el porcentaje de alanina (tabla 2). La variante ancestral g.29716773T produce un punto isoelectrico menor, una proteína más estable (aunque es clase II) y conduce una ZO-1 con mayor índice de hidrofobicidad. El estudio de la estructura secundaria muestra que la variante ancestral g.29716773T de *TJP1* produce una proteína ZO-1 con mayor contenido de vueltas- β y menos contenido de α -hélices (tabla 3, fig. 4).

Discusión

Este es el primer estudio realizado en la población mexicana, que muestra la frecuencia de alelos y genotipos del polimorfismo rs2291166 de *TJP1*. El alelo T, los genotipos TT, TG fueron los más frecuentes, como en mexicoamericanos y otras poblaciones (tabla 1)⁸. El genotipo homocigoto G (GG) del SNP rs2291166, solo ha sido reportado en una muestra amplia de más de 1,000 Europeos (proyecto

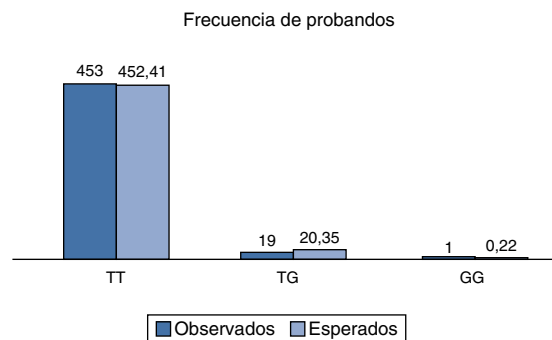


Figura 3 Estudio del EHW para el polimorfismo rs2291166 de *TJP1* en México.

Tabla 1 Frecuencia de alelos y genotipos del polimorfismo rs2291166 del gen *TJP1*

Población	Número de cromosomas	Genotipos			Alelos	
		TT	TG	GG	T	G
<i>Grupos étnicos en Estados Unidos de Norte América</i>						
Residentes de los Ángeles, California, con ancestría china	48	0.958	0.042	0.0	0.979	0.021
Caucásicos con ancestría europea	48	0.792	0.208	0.0	0.104	0.896
Residentes de Utah con ancestría europea	120	0.867	0.133	0.0	0.933	0.067
Residentes de Utah norte y este con ancestría europea	226	0.885	0.115	0.0	0.942	0.058
Residentes del sureste con ancestría africana	98	0.980	0.020	0.0	0.990	0.010
Afroamericanos	46	0.913	0.087	0.0	0.957	0.043
Indios Gujara, de Houston Texas	176	0.864	0.136	0.0	0.932	0.068
<i>Poblaciones europeas</i>						
Descendientes de europeos del proyecto ClinSeq	1,323	0.894	0.101	0.005	0.945	0.056
Toscanos italianos	176	0.943	0.057	0.0	0.972	0.028
Europeos, banco de células Coriel Cell Repository	30	0.867	0.133	0.0	0.967	0.033
<i>Poblaciones o grupos étnicos africanos</i>						
Luhya en Webeye, Kenia África	180	0.978	0.022	0.0	0.989	0.11
Masaian Kenia	286	0.895	0.084	0.021	0.937	0.063
Yoruba, Ibadán, Nigeria, Subsahara África, HapMapYRI	224	0.982	0.018	0.0	0.991	0.009
Yoruba in Ibadán, Nigeria, Subsahara África	120	0.983	0.017	0.0	0.992	0.008
<i>Poblaciones o grupos étnicos asiáticos</i>						
Asiáticos de la tribu Han de Beijing China	86	0.977	0.023	0.0	0.988	0.012
Asiáticos tribu Han de Beijing, China Hap-Map HCB	80	0.950	0.050	0.0	0.975	0.025
Asiáticos de la tribu Han de Beijing, China Hap-Map JPT	90	0.978	0.022	0.0	0.989	0.011
Asiáticos de Tokio Japón, Hap Map JPT	172	0.965	0.035	0.0	0.983	0.017
Asiáticos de Tokio Japón	90	0.956	0.044	0.0	0.978	0.022
Chinos en Metropolitan Denver, Colorado	168	0.917	0.083	0.0	0.958	0.042
<i>Otras poblaciones o grupos étnicos</i>						
Residentes de los Ángeles, con ancestría mexicana	100	0.940	0.060	0.0	0.970	0.030
Hispanos, banco de células Coriel Cell Repository	44	1.0	0.0	0.0	1.0	0.0
Población aparentemente sana, Coriel Cell Repository	68	0.735	0.235	0.029	0.853	0.147
<i>Este estudio, población total mestiza mexicana</i>	946	0.957	0.041	0.002	0.978	0.022

Alelos: T o G; ClinSeq: a Large-Scale Medical Sequencing Clinical Research Pilot Study; genotipos: homocigotos T (TT) o G (GG), heterocigoto (TG); HapMap: mapa de haplotipos, catálogo de variantes genéticas comunes en humanos; HCB: muestras de la fase 3 del grupo étnico Han de Beijing China; JPT: muestras de la fase 3 de población japonesa de Tokio; YRI: muestras de la fase 3 de población con ancestría Yoruba de Ibadán Nigeria, África.

ClinSeq; A Large-Scale Medical Sequencing Clinical Research Pilot Study) ($fr = 0.005$), en los Maasai de Kenia ($fr = 0.021$), en población aparentemente sana de la colección AGI-ASP ($fr = 0.029$) y ahora en México ($fr = 0.002$). Estos resultados se puede explicar por tres hipótesis: la *primera*, la cual postula que las frecuencias presentadas en este estudio son producto del mestizaje, apoyado en algunos reportes previos con Y-STR's (Short Tandem Repeats), que muestran hasta un 3-5% de ancestría africana y un 65% de ancestría europea²⁸. La *segunda*, que argumenta que la frecuencia de alelos se conservó durante el mestizaje de los nativos amerindios, como se ha observado para los alelos *A, *B y *C del polimorfismo (GC) del gen para la fosfatasa ácida de eritrocitos²⁹. La *tercera*, que refiere que la baja frecuencia del homocigoto G está relacionada con una selección en contra, teniendo un efecto fenotípico severo asociado a la muerte por daño renal, lo que se apoya por los estudios realizados en los mexicoamericanos por Lehman et al.⁸. Por otra

parte, también se validó que la variante rs2291166, sí es un polimorfismo presente en México, ya que su distribución de genotipos está en equilibrio de Hardy Weinberg y para establecer este parámetro fue necesario un estudio previo de asociación, para reducir la posibilidad de falsos positivos o sesgos de información relacionados con la falta de verosimilitud del marcador, como lo reporta Topete-González et al.⁷.

En el presente trabajo, se incluyó un número mayor de probandos de los reportados en el banco de SNP's, muy similar a la muestra de descendientes de europeos del proyecto ClinSeq, lo que reduce de manera importante la posibilidad de estos sesgos, proporcionando certeza de los resultados presentados³⁰, lo que se refleja con la detección de portadores homocigotos G, cuya frecuencia es muy escasa; por otra parte, el estudio *in silico* revela un efecto patogénico del SNP rs2291166 de *TJP1*, ya que la transversión T > G se traduce en la sustitución de aspartato por valina,

Tabla 2 Efecto del polimorfismo rs2291166 en la estructura primaria de ZO-1

Parámetros físico-químicos	Variante g.29716773T (p.D1334)	Variante g.29716773G (p.A1334)
Número de aminoácidos	1835	1835
Peso molecular	205075.0	205031.0
Punto isoeléctrico teórico	6.42	6.46
No. de átomos	28544	28541
Coefficiente de extinción molar asumiendo todos los pares de residuos de la cisteína	150275	150275
Coefficiente de extinción molar asumiendo que todos los residuos cisteína están reducidos	149900	149900
Vida media en horas		
En reticulocito en <i>in vivo</i>	30	30
En levadura	20	20
En <i>Echerichia coli</i> .	10	10
Índice de estabilidad (clase II)	58.50	58.60
Índice alifático	63.61	63.66
Índice de hidrofobicidad	-0.895	-0.892
No. total de residuos cargados + (R + E)	253	252
No. total de residuos cargados + (R + K)	236	236
Alanina (A) 112	6.1%	6.2%
Arginina (R) 123	6.7%	6.7%
Asparagina (N) 73	4.0%	4.0%
Aspartato (D) 112	6.1%	6.0%
Cisteína (C) 7	0.4%	0.4%
Glutamato (Q) 90	4.9%	4.9%
Glutamina (E) 141	7.7%	7.7%
Glicina (G) 96	5.2%	5.2%
Histidina (H) 58	3.2%	3.2%
Isoleucina (I) 70	3.8%	3.8%
Leucina (L) 121	6.6%	6.6%
Lisina (K) 113	6.2%	6.2%
Metionina (M) 22	1.2%	1.2%
Fenilalanina (F) 51	2.8%	2.8%
Prolina (P) 179	9.8%	9.8%
Serina (S) 197	10.7%	10.7%
Treonina (T) 92	5.0%	5.0%
Triptofano (W) 11	0.6%	0.6%
Tirosina (Y) 60	3.3%	3.3%
Valina (V) 107	5.8%	5.8%
Pirrolisina (O) 0	0.0%	0.0%
Selenocisteína (U) 0	0.0%	0.0%

que lleva a un cambio conformacional en ZO-1. La variante p.1334D produce una isoforma más estable (tabla 2, fig. 4), este cambio se correlaciona con las modificaciones en la estructura primaria; índice de hidrofobicidad, que es mayor en la isoforma ancestral (tabla 2). Estos resultados más la asociación de la variante p.1334D > A, con la tasa urinaria de albumina/creatinina y con albuminuria, apoyan la teoría de la patología conformacional en la patogénesis de las

enfermedades, como lo ha postulado Hayden et al.²⁴. El efecto del cambio estructural tendrá que ser demostrado por estudios de isoelectroenfoque, cristalografía y difracción con rayos X que se puede realizar porque las dos isoformas de ZO-1 presentan punto isoeléctrico diferente; sin embargo, estas perspectivas no formaron parte de los objetivos de este estudio.

Si consideramos que la pancreatitis aguda, la mola hidatiforme y varios tipos de cáncer, tienen en común la alteración de la arquitectura celular, sea por pérdida de moléculas de contacto célula-célula o por el incremento en la expresión de estas moléculas, y de la movilidad a través de la matriz extracelular; por lo tanto, el polimorfismo rs2291166 de TJP1 debe ser analizado para determinar el efecto en el riesgo de desarrollo, tomando en cuenta que estas alteraciones son causadas también por cambios estructurales de las proteínas del citoesqueleto como de la matriz extracelular. También pueden ser marcadores de susceptibilidad para enfermedades complejas o emergentes, donde está alterada la arquitectura de las uniones estrechas (ZO-1), como se ha demostrado en cultivos de células de leucemia aguda y síndromes mielodisplásicos, mediante el silenciamiento por hipermetilación³¹⁻³³. Para el caso de las infecciones por cosackievirus, adenovirus, virus de la hepatitis C, virus de la inmunodeficiencia humana tipo 1 (HIV) y por papilomavirus (VPH); en los primeros la infección es contenida siempre y cuando las uniones estrechas epiteliales intestinales mantengan su estructura; para el segundo, virus de la hepatitis C se une a las uniones estrechas promoviendo la retención de las ocludinas en el retículo endoplasmático; y para el tercer y cuarto casos, la expresión de proteínas del HIV en la mucosa epitelial cervical correlacionan con la disrupción de ZO-1, e incrementan la expresión del pseudovirión del papilomavirus para la penetración de las células basales así como las parabasales, en las cuales inicia el ciclo de vida del HIV. Así, la alteración de ZO-1 potencia la carcinogénesis de cérvix asociada a papilomavirus, relevante para los ginecólogos colposcopistas³⁴⁻³⁶. La predisposición genética del SNP rs2291166 para gastritis por *Helicobacter pylori*, será de los futuros trabajos a realizar, ya que este produce disrupción de ZO-1, en las células epiteliales gástricas³⁷.

Por último, los cambios de aminoácido modifican a la estructura y función de las proteínas (para ZO-1, la permeabilidad celular), por ello es obligado analizar el efecto de polimorfismos de ZO-1 con problemas cardiovasculares, ya que en células endoteliales, y en triglicéridos producto de hidrólisis de la lipoproteína lipasa, incrementan la permeabilidad de ZO-1, y la hipercolesterolemia sérica produce alteración en la distribución y vía de la PI3K (fosfatidil-inositol-3-quinasa). En insuficiencia cardíaca por cardiomiopatía isquémica o dilatada, también existe una marcada disminución de ZO-1 y la conexina 43³⁸⁻⁴⁰.

En dermatología los polimorfismos de TJP1 como el SNP rs2291166 pueden ser un factor modificador de la severidad en dermatosis caracterizadas por la pérdida de la arquitectura de la piel, como psoriasis y epidermolisis bullosa. Esto se ve apoyado en que la psoriasis está relacionada con la resistencia a la insulina, y la expresión de TJP1 es regulada positivamente por IGF-1 (insulin-like growth factor type 1, factor de crecimiento semejante a la insulina tipo 1), como se ha demostrado en cultivos de células de carcinoma epidermoide^{41,42}.

Predicción para el modelo conformacional para el polimorfismo de *TJP1*

Variante g.29716773T (p.D1334)

KTLYRIPEPQKPQLKPPEDIVRSNHYAPEEDEEYRKQLSYFDRRSFENKPPAHIAASHL
 Helice HHHHHHHH HHHHHHHH
 Hoja B EE EEEEE EEEE
 Vuelta TTTT TT TT T TTTT
 Cola CC C CCCC CCCCC CCC C

Variante g.29716773G (p.A1334)

KTLYRIPEPQKPQLKPPEDIVRSNHYAPEEDEEYRKQLSYFDRRSFENKPPAHIAASHL
 Helice HHHHHHHH HHHHHHHH
 Hoja B EE EEEEE EEEE
 Vuelta TTTT TT TT T TTTT
 Cola CC C CCCC CCCCC CCC C

Figura 4 Efecto conformacional del polimorfismo rs2291166 de *TJP1* en *ZO-1*. De amarillo subrayado se aprecia el cambio de aminoácido y de verde el cambio conformacional que se caracteriza por una introducción de una vuelta-β asociada a la alanina en el residuo 1334. El color de esta figura solo puede apreciarse en la versión electrónica del artículo.

Tabla 3 Efecto del polimorfismo rs2291166 en la estructura secundaria de *ZO-1*

Estructura secundaria	Variante g.29716773T (p.D1334)	1,835 aminoácidos	Variante g.29716773G (p.A1334)	1,835 aminoácidos
Parámetro	Número de residuos	% de residuos	Número de residuos	% de residuos
α-hélices (H)	453	24.9	454	25.0
Hojas-β (E)	359	19.7	359	19.7
Vueltas-β (T)	450	24.7	449	24.7
Colas aleatorias (C)	573	31.5	573	31.5

Conclusiones

Se estableció la frecuencia de alelos y genotipos así como el equilibrio Hardy Weinberg en la población mexicana, con respecto al polimorfismo rs2291166 del gen *TJP1*, por lo cual queda validado para realizar futuros estudios de asociación en el campo de la clínica-quirúrgica en México. También se estableció la similitud de la distribución relativa de alelos y genotipos con otras poblaciones, asemejándose a las poblaciones europeas y africana. Y finalmente *in silico* se demostró que este polimorfismo conduce a un cambio putativo estructural de la proteína *ZO-1*, generando dos isoformas, la isoforma ancestral o p.1334D, que proporciona una proteína con más estabilidad conformacional.

Financiamiento

Financiado por el Laboratorio de Variación Genética y Enfermedad, de la Benemérita Universidad de Guadalajara y al Grupo Multidisciplinario para el Estudio Integral de las Enfermedades Metabólicas e Infecciosas en población mexicana.

Conflicto de intereses

Los autores declaran no tener ningún conflicto de intereses.

Agradecimientos

A Sergio A. Ramirez Garcia y Luis Javier Flores Alvarado, ya que ambos autores contribuyeron igual al desarrollo del trabajo. Por su apoyo técnico y colaboración; a los becarios del Programa de Incorporación a la Investigación Temprana en Ciencias Biomédicas y Sociales, Delegación Sur de SOGE-JAL 2010-2012: Jareth Marco Cruz Bastida y Jafet Said Cruz Bastida, que participaron en la recolección de muestras, toma de los consentimientos informados, análisis estadístico, diseño de cuadros y figuras. También a la Sra. Dora Cervantes, Presidenta y Mtra. Magdalena Cruz, Directora para el periodo 2010-2012 del Sistema para el Desarrollo Integral de la Familia de la Delegación Chapala Jalisco, por el apoyo de la Consulta Externa de la Unidad de Investigación Biomolecular, para captación de probandos. Al Gerente General de Laboratorios Tolsa Eduardo Ascuita Ramos por su apoyo para la realización del estudio.

Bibliografía

1. Lara-Vélez V, Chávez-López R, Flores-Villacencio ME, Ramos-Zepeda A, editores. De la genética a la medicina genómica. 1.th ed. Guadalajara, México: Universidad de Guadalajara; 2012. p. 9–55.

2. Jimenez-Sanchez G, Silva-Zolezzi I, Hidalgo A, March S. Genomic medicine in México: Initial steps and the road ahead. *Genome Res.* 2008;18(8):1191–8.
3. Oliva-Sánchez PF, Siqueiros-García JM, Vázquez-González JR, Saruwatari-Zavala G, Carnevale A. La medicina genómica en las políticas de salud pública: una perspectiva de investigadores mexicanos del área biomédica. *Salud Pública Mex.* 2013;55(1):16–25.
4. Veras-Castillo ER, Cárdenas-Camarena L, Lyra-Gonzalez I, Muñoz-Valle JF, Lucano-Landeros S, Guerrosantos J, et al. Controlled clinical trial with pirfenidone in the treatment of breast capsular contracture: association of TGF- β polymorphisms. *Ann Plast Surg.* 2013;70(1):16–22.
5. Armendáriz-Borunda J, Rincón AR, Muñoz-Valle JF, Bueno-Topete M, Oregón-Romero E, Islas-Carbajal MC, et al. Fibrogenic polymorphisms (TGF- β , PAI-1, AT) in mexican patients with established liver fibrosis. Potential correlation with pirfenidone treatment. *J Investig Med.* 2008;56(7):944–53.
6. Sánchez-Parada MG, Álvarez-Rodríguez BA, Gómez-Meda BC, Troyo-Sanromán R, Sánchez-Orozco LV, Zamora-Perez AL, et al. Association of genetic polymorphisms with histological grading of necroinflammation, staging of fibrosis, and liver function in mexicans with chronic hepatitis C virus infection. *J Investig Med.* 2013;61(7):1088–96.
7. Topete-González LR, Ramírez-García SA, Charles-Niño C, Villa-Ruano N, Mosso-González C, Dávalos-Rodríguez NO. Polymorphism g.37190613 G > A of the ELMO1 gene in the mexican population: potential marker for clinical-surgical pathology. *Cir Cir.* 2014;82(4):403–11.
8. Lehman DM, Leach RJ, Johnson-Pais T, Hamlington J, Fowler S, Almasy L, et al. Evaluation of tight junction protein 1 encoding zona occludens 1 as a candidate gene for albuminuria in a mexican american population. *Exp Clin Endocrinol Diabetes.* 2006;114(8):432–7.
9. Tien T, Barrette KF, Chronopoulos A, Roy S. Effects of high glucose-induced Cx43 downregulation on occludin and ZO-1 expression and tight junction barrier function in retinal endothelial cells. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 2013;54(10):6518–25.
10. Lee JF, Zeng Q, Ozaki H, Wang L, Hand AR, Hla T, et al. Dual roles of tight junction-associated protein, zonula occludens-1, in sphingosine 1-phosphate-mediated endothelial chemotaxis and barrier integrity. *J Biol Chem.* 2006;281(39):29190–200.
11. Li R, Ning Z, Cui J, Yu F, Sioutas C, Hsiai T. Diesel exhaust particles modulate vascular endothelial cell permeability: Implication of ZO-1 expression. *Toxicol Lett.* 2010;197(3):163–8.
12. Pidoux G, Gerbaud P, Gnidehou S, Grynberg M, Geneau G, Guibourdenche J, et al. ZO-1 is involved in trophoblastic cell differentiation in human placenta. *Am J Physiol Cell Physiol.* 2010;298(6):C1517–26.
13. Marziani D, Banita M, Felici A, Paradinas FJ, Newlands E, De Nicolis M, et al. Expression of ZO-1 and occludin in normal human placenta and in hydatidiform moles. *Mol Hum Reprod.* 2001;7(3):279–85.
14. Németh Z, Szász AM, Somorácz Á, Tátrai P, Németh J, Györfy H, et al. Zonula occludens-1, occludin, and E-cadherin protein expression in biliary tract cancers. *Pathol Oncol Res.* 2009;15(3):533–9.
15. Erin N, Wang N, Xin P, Bui V, Weisz J, Barkan GA, et al. Altered gene expression in breast cancer liver metastases. *Int J Cancer.* 2009;124(7):1503–16.
16. Tian R, Wang RL, Xie H, Jin W, Yu KL. Overexpressed miRNA-155 dysregulates intestinal epithelial apical junctional complex in severe acute pancreatitis. *World J Gastroenterol.* 2013;19(45):8282–91.
17. Kleeff J, Shi X, Bode HP, Hoover K, Shrikhande S, Bryant PJ, et al. Altered expression and localization of the tight junction protein ZO-1 in primary and metastatic pancreatic cancer. *Pancreas.* 2001;23(3):259–65.
18. Resnick MB, Konkin T, Routhier J, Sabo E, Pricolo VE. Claudin-1 is a strong prognostic indicator in stage II colonic cancer: a tissue microarray study. *Mod Pathol.* 2005;18(4):511–8.
19. Kojima T, Sawada N. Regulation of tight junctions in human normal pancreatic duct epithelial cells and cancer cells. *Ann N Y Acad Sci.* 2012;1257:85–92.
20. Orbán E, Szabó E, Lotz G, Kupcsulik P, Páska C, Schaff Z, et al. Different expression of occludin and ZO-1 in primary and metastatic liver tumors. *Pathol Oncol Res.* 2008;14(3):299–306.
21. Kaihara T, Kawamata H, Imura J, Fujii S, Kitajima K, Omotehara F, et al. Redifferentiation and ZO-1 reexpression in liver-metastasized colorectal cancer: Possible association with epidermal growth factor receptor-induced tyrosine phosphorylation of ZO-1. *Cancer Sci.* 2003;94(2):166–72.
22. Zhu H, Lu J, Wang X, Zhang H, Tang X, Zhu J, et al. Upregulated ZO-1 correlates with favorable survival of gastrointestinal stromal tumor. *Med Oncol.* 2013;30(3):631, <http://dx.doi.org/10.1007/s12032-013-0631-7>.
23. Ni S, Xu L, Huang J, Feng J, Zhu H, Wang G, et al. Increased ZO-1 expression predicts valuable prognosis in non-small cell lung cancer. *Int J Clin Exp Pathol.* 2013;6(12):2887–95.
24. Hayden MR, Tyagi SC, Kerklo MM, Nicolls MR. Type 2 diabetes mellitus as a conformational disease. *JOP L Pancreas.* 2005;6(4):287–302.
25. Coon H, Villalobos ME, Robison RJ, Camp NJ, Cannon DS, Allen-Brady K, et al. Genome-wide linkage using the social responsiveness scale in Utah autism pedigrees. *Mol Autism.* 2010;1(1):8, <http://dx.doi.org/10.1186/2040-2392-1-8>.
26. Clark SL, Souza RP, Adkins DE, Åberg K, Bukszár J, McClay JL, et al. Genome-wide association study of patient and clinician-rated global impression of severity during antipsychotic treatment. *Pharmacogenet Genomics.* 2013;23(2):69–77, <http://dx.doi.org/10.1097/FPC.0b013e32835ca260>.
27. Lu Y, Vitart V, Burdon KP, Khor CC, Bykhovskaya Y, Mirshahi A, et al. Genome-wide association analyses identify multiple loci associated with central corneal thickness and keratoconus. *Nat Genet.* 2013;45(2):155–63, <http://dx.doi.org/10.1038/ng.2506>.
28. Salazar Flores J, Dondiego Aldape R, Rubi Castellanos R, Anaya Palafox M, Nuño Arana I, Canseco Ávila LM, et al. Population structure and paternal admixture landscape on present-day mexican-mestizos revealed by Y-STR haplotypes. *Am J Hum Biol.* 2010;22(3):401–9, <http://dx.doi.org/10.1002/ajhb.21013>.
29. Lisker R, Ramírez E, Peñaloza R, Salamanca F. Red cell acid phosphatase types and GC polymorphisms in Mérida, Oaxaca, León, and Saltillo, Mexico. *Hum Biol.* 1994;66(6):1103–9.
30. Flores-Alfaro E, Burguete-García AI, Salazar-Martínez E. Diseños de Investigación en epidemiología genética. *Rev Panam Salud Pública.* 2012;31(1):88–94.
31. Dou LP, Liu JH, Wang C, Zhao Y, Wang QS, Liu JH, et al. Study on the involvement of ZO-1 gene in leukemogenesis. *Zhonghua Xue Ye Xue Za Zhi.* 2009;30(7):473–6.
32. Dou LP, Liu JH, Wang C, Zhao Y, Wang QS, Liu JH, et al. Preliminary study on leukemia related gene zo-1 involved in pathogenesis of leukemia. *Zhongguo Shi Yan Xue Ye Xue Za Zhi.* 2009;17(5):1140–3.
33. Kang HY, Wang C, Dou LP, Qing Y, Han XP, Sun JF, et al. Methylation status of ZO-1 gene in patients with myelodysplastic syndrome. *Zhongguo Shi Yan Xue Ye Xue Za Zhi.* 2008;16(1):70–3.
34. Cohen CJ, Shieh JTC, Pickles RJ, Okegawa T, Hsieh JT, Bergelson JM. The coxsackievirus and adenovirus receptor is a transmembrane component of the tight junction. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2001;98(26):15191–6.
35. Tugizov SM, Herrera R, Chin-Hong P, Velupillai P, Greenspan D, Michael Berry J, et al. HIV-associated disruption

- of mucosal epithelium facilitates paracellular penetration by human papillomavirus. *Virology*. 2013;446(1-2):378-88, <http://dx.doi.org/10.1016/j.virol.2013.08.018>.
36. Benedicto I, Molina-Jiménez F, Barreiro O, Maldonado-Rodríguez A, Prieto J, Moreno-Otero R, et al. Hepatitis C virus envelope components alter localization of hepatocyte tight junction-associated proteins and promote occludin retention in the endoplasmic reticulum. *Hepatology*. 2008;48(4):1044-53, <http://dx.doi.org/10.1002/hep.22465>.
 37. Krueger S, Hundertmark T, Kuester D, Kalinski T, Peitz U, Roessner A. *Helicobacter pylori* alters the distribution of ZO-1 and p120ctn in primary human gastric epithelial cells. *Pathol Res Pract*. 2007;203(6):433-44.
 38. Eiselein L, Wilson DW, Lamé MW, Rutledge JC. Lipolysis products from triglyceride-rich lipoproteins increase endothelial permeability, perturb zonula occludens-1 and F-actin, and induce apoptosis. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. 2007;292(6):H2745-53.
 39. Bian C, Xu G, Wang J, Ma J, Xiang M, Chen P. Hypercholesterolaemic serum increases the permeability of endothelial cells through zonula occludens-1 with phosphatidylinositol 3-kinase signaling pathway. *J Biomed Biotechnol*. 2009;2009:814979, <http://dx.doi.org/10.1155/2009/814979>.
 40. Bruce AF, Rothery S, Dupont E, Severs NJ. Gap junction remodeling in human heart failure is associated with increased interaction of connexin43 with ZO-1. *Cardiovasc Res*. 2008;77(4):757-65.
 41. Ko JA, Murata S, Nishida T. Up-regulation of the tight-junction protein ZO-1 by substance P and IGF-1 in A431 cells. *Cell Biochem Funct*. 2009;27(6):388-94, <http://dx.doi.org/10.1002/cbf.1587>.
 42. Martínez-Abundis E, Reynoso-von Drateln C, Hernández-Salazar E, González-Ortiz M. Effect of etanercept on insulin secretion and insulin sensitivity in a randomized trial with psoriatic patients at risk for developing type 2 diabetes mellitus. *Arch Dermatol Res*. 2007;299(9):461-5.