

Karina Janett Juárez-Rendón,  
Ricardo Alejandro Lara-Aguilar,  
José Elías García-Ortiz

# Duplicación 24-pb en el gen *CHIT1* en población mexicana

División de Genética,  
Centro de Investigación Biomédica de Occidente,  
Centro Médico Nacional de Occidente,  
Instituto Mexicano del Seguro Social, Guadalajara, Jalisco, México

Comunicación con: José Elías García-Ortiz  
Tel: (33) 3668 3000, extensión 31929. Fax: (33) 3617 1856  
Correo electrónico: jose.garciaor@imss.gob.mx

## Resumen

**Introducción:** la quitotriosidasa (*CHIT1*) es una enzima secretada por macrófagos activados, detectable en plasma. Sus niveles indican la severidad de enfermedades como la de Gaucher y permiten monitorizar la efectividad del tratamiento. El polimorfismo más frecuente en el gen de la quitotriosidasa es una duplicación de 24-pb (Dup 24-pb), que en estado homocigoto ocasiona la inactivación de la enzima. El objetivo de esta investigación fue identificar Dup 24-pb en el gen *CHIT1* y determinar las frecuencias alélicas y genotípicas.

**Métodos:** se analizaron 306 muestras de individuos sanos en geles de poliacrilamida y se determinaron las frecuencias alélicas y genotípicas mediante SPSS versión 13.0.

**Resultados:** la distribución de la Dup 24-pb en el gen *CHIT1* estuvo en equilibrio Hardy-Weinberg ( $p = 0.90$ ), con una frecuencia alélica de 23.86 %. Las frecuencias genotípicas para homocigotos y heterocigotos fue de 5.56 y 36.6 %, respectivamente.

**Conclusiones:** las frecuencias alélicas y genotípicas de los homocigotos y heterocigotos para Dup 24-pb en el gen *CHIT1* corresponden con las informadas en el mundo.

## Palabras clave

quitotriosidasa  
enfermedad de Gaucher  
polimorfismo genético

## Summary

**Background:** human chitotriosidase is a secreted enzyme by activated macrophages, detectable in plasma. Levels of chitotriosidase indicate severity of Gaucher disease and monitoring the efficiency of the enzyme replacement therapy. The most frequent polymorphism in chitotriosidase-1 gene (*CHIT1*) corresponds to a 24-bp duplication (24-bp Dup) that in homozygotes individuals gives place to the enzyme inactivation. The objective was to identify in a sample of Mexican health population the 24-bp Dup in *CHIT1* gene and determinate the allelic and genotypic frequencies.

**Methods:** 306 DNA samples of healthy individuals were analyzed in polyacrylamide gels and the allelic and genotypic frequencies was determined with SPSS v. 13.0.

**Results:** distribution of the 24-bp Dup was in accordance to Hardy-Weinberg equilibrium ( $p = 0.90$ ), with an allelic frequency of 23.86 %. Genotypic frequencies for homozygous and heterozygotes were of 5.56 % and 36.60 % respectively.

**Conclusions:** allelic and genotypic frequencies of the 24-bp Dup in *CHIT1* gene in homozygotes and heterozygotes were in accordance to worldwide reports.

## Key words

chitotriosidase  
Gaucher disease  
polymorphism, genetic

Las quitinasas son enzimas que hidrolizan el polisacárido quitina en especies no vertebradas como hongos, nematodos e insectos.<sup>1</sup> En el humano, su análogo es la quitotriosidasa,<sup>2</sup> miembro de la familia de las quitinasas, un grupo de glucosilhidrolasas con capacidad para degradar quitina,<sup>3</sup> la segunda proteína estructural más abundante en la naturaleza después de la celulosa.<sup>4</sup> La quitotriosidasa humana es secretada por macrófagos activados y detectables en plasma; ha sido usada como biomarcador en enfermedades lisosomales

como la enfermedad de Gaucher, en la que sus niveles en plasma aumentan más de 1000 veces.<sup>4,5</sup> La cuantificación de los niveles de quitotriosidasa sirve para determinar la gravedad de la enfermedad y para monitorizar la efectividad de la terapia de reemplazo enzimático.<sup>6</sup>

El gen *CHIT1* (OMIM 600031)<sup>7</sup> fue clonado en 1995, consta de 12 exones, se localiza en 1q31-q32, mide 20 kb y codifica para una proteína con dos isoformas: la primera con un peso molecular de 50 kDa y la segunda de 39 kDa,

**Cuadro I** | Distribución alélica y genotípica del polimorfismo Dup 24-pb en el gen *CHIT1* en población mexicana

Genotipos	Individuos (n = 306/612)		p	χ <sup>2</sup>
	n	%		
Wt/Wt	177	57.84	0.97	ns
Wt/Dup	112	36.60	0.98	ns
Dup/Dup	17	5.56	0.99	ns
<b>Alelos</b>	<b>n</b>	<b>f. a.</b>		
Wt	466	76.14	0.90	–
Dup	146	23.86	–	–

caracterizada por su actividad hidrolasa y acumulación en lisosomas.<sup>8,9</sup> Se han descrito algunos polimorfismos en el gen *CHIT1*,<sup>10</sup> el más frecuente está ubicado en el exón 10, el cual corresponde a una duplicación de 24-pb (Dup 24-pb), que da lugar a la delección de los aminoácidos 344-372.<sup>11</sup>

Existen estudios poblacionales que informan cerca de 6 % de individuos en estado homocigoto para la duplicación, lo que da como resultado un efecto de inactivación completa de la enzima, aunque sin repercusión clínica. De igual forma, se ha indicado que aproximadamente 35 % es heterocigoto para dicho polimorfismo.<sup>12</sup> Por otro lado, análisis genéticos poblacionales han demostrado el origen ancestral de la duplicación y se cree que su distribución es mundial;<sup>4,13</sup> sin embargo, es importante establecer la frecuencia en cada población, con la finalidad de validar a la quitotriosidasa como un biomarcador confiable.<sup>13</sup>

### Métodos

Se obtuvo sangre periférica de 306 adultos sanos no emparentados, originarios de la zona metropolitana de Guadalajara, Jalisco, México, y de sus alrededores. No se tomó en cuenta el sexo ni la edad. Se extrajo ADN de cada uno mediante el método de precipitación con sales de Miller.<sup>14,15</sup> El análisis del polimorfismo Dup 24-pb se realizó mediante reacción en cadena de la polimerasa (PCR) punto final, con los siguientes iniciadores: 5'-AGCTATCTGAAGCAGAAG-3' y 5'-GGAGAAGCCGGCAAAGTC-3'.

El volumen de reacción de la PCR fue de 20 µL, que contienen 1.25 mM de dNTPs, 10 pmol de cada iniciador, 50 mM de

MgCl<sub>2</sub> y 1 UI de enzima Taq ADN polimerasa. La PCR se inició con una temperatura de 94 °C (dos minutos), seguida de 35 ciclos de 95 °C (30 segundos), alineamiento de 57 °C (30 segundos), extensión de 72 °C (30 segundos) y extensión final de 72 °C (cuatro minutos). Este procedimiento permitió obtener los fragmentos de 75 y 99 pb (discriminando así entre los alelos normal y mutante), observados mediante electroforesis en geles de poliacrilamida a 6 %, teñidos con nitrato de plata,<sup>16</sup> y con el analizador de imagen GEL-DOC 1000 y el *software* Quantity One, Quantitation V. 4.2 para Windows (Discovery Series 2000, Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA).

Las frecuencias alélicas y genotípicas y el equilibrio de Hardy-Weinberg fueron obtenidos por medio del *software* SSPS versión 13.0 (SPSS, Chicago, IL).

### Resultados

El análisis del polimorfismo Dup 24-pb del gen *CHIT1* en población mexicana mostró 177 individuos con genotipo homocigoto silvestre (Wt/Wt), 112 con genotipo heterocigoto (Dup/Wt) y 17 con genotipo homocigoto para Dup 24-pb (Dup/Dup). Las frecuencias alélicas obtenidas estuvieron en equilibrio de Hardy-Weinberg ( $p = 0.90$ ) con una frecuencia de 23.8 %. Las frecuencias genotípicas para homocigotos y heterocigotos mostraron valores de 5.56 y 36.6 %, respectivamente. El cuadro I muestra las frecuencias alélicas y genotípicas del polimorfismo Dup 24-pb en el gen *CHIT1*.

### Discusión

El papel de la actividad enzimática de la quitotriosidasa en humanos no ha sido establecido con precisión, sin embargo, algunos estudios en poblaciones de Europa han mostrado la participación de esta enzima en procesos inmunológicos.<sup>9</sup> Es bien conocida la nula significación clínica del polimorfismo Dup 24-pb en el gen *CHIT1*,<sup>3,13,14</sup> aunque el uso de la quitotriosidasa como biomarcador en el monitoreo del tratamiento en pacientes con enfermedad de Gaucher hace relevante su determinación bioquímica y molecular, al permitir la identificación de los individuos con deficiencia completa de la enzima (Dup/Dup), con deficiencia moderada (Dup/Wt) y con actividad normal (Wt/Wt).<sup>5</sup> En nuestra población de estudio, la caracterización del polimorfismo Dup 24-pb en el gen *CHIT1* no ha sido previamente descrita, aunque la determinación enzimática es de uso común y en nuestro laboratorio se realiza de forma rutinaria a los pacientes con enfermedad de Gaucher.

Nuestros resultados mostraron una frecuencia alélica de 23.8 % para Dup 24-pb y una frecuencia genotípica para homocigotos y heterocigotos de 5.56 y 36.6 %, respectivamente, lo que corresponde con los rangos informados en el mundo.<sup>6,8</sup>

## Conclusiones

Las frecuencias alélicas y genotípicas del polimorfismo Dup 24-pb obtenidas en la población analizada correspondieron con las informadas en el mundo.

Los resultados nos permitirán continuar con el estudio molecular de la quitotriosidasa como biomarcador en pacientes con enfermedad de Gaucher diagnosticados en el

Centro de Investigación Biomédica de Occidente, en Guadalajara, Jalisco, y en los enviados para monitoreo de la respuesta al tratamiento.

## Agradecimientos

A Lorena Aguilar Yerenas.

## Referencias

1. Bierbaum S, Superti-Furga A, Heinzmann A. Genetic polymorphisms of chitotriosidase in Caucasian children with bronchial asthma. *Int J Immunogenet* 2006;33(3):201-204.
2. Aerts JM, van Breemen MJ, Bussink AP, Ghauharali K, Sprenger R, Boot RG, et al. Biomarkers for lysosomal storage disorders: identification and application as exemplified by chitotriosidase in Gaucher disease. *Acta Paediatr Suppl* 2008;97(457):7-14.
3. Malaguarnera L. Chitotriosidase: the yin and yang. *Cell Mol Life Sci* 2006;63(24):3018-3029.
4. Lee P, Waalen J, Crain K, Smargon A, Beutler E. Human chitotriosidase polymorphisms G354R and A442V associated with reduced enzyme activity. *Blood Cells Mol Dis* 2007;39(3):353-360.
5. Malaguarnera L, Ohazuruike LN, Tsianaka C, Antic T, Di Rosa M, Malaguarnera M. Human chitotriosidase polymorphism is associated with human longevity in Mediterranean nonagenarians and centenarians. *J Hum Genet* 2010;55(1):8-12.
6. Giraldo P, Cenarro A, Alfonso P, Pérez-Calvo J, Rubio-Félix D, Giralto M, et al. Chitotriosidase genotype and plasma activity in patients with type 1 Gaucher's disease and their relatives (carriers and non-carriers). *Haematologica* 2001;86(9):977-984.
7. Online Mendelian Inherited in Man. [Sitio web]. Chitinase 1; Chit 1. [Consultado en julio de 2011]. Disponible en <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/dispomim.cgi?id=600031>
8. Boot RG, Renkema GH, Verhoek M, Strijland A, Bliet J, de Meulemeester TM, et al. The human chitotriosidase gene. Nature of inherited enzyme deficiency. *J Biol Chem* 1998; 273(40):25680-25685.
9. Di Rosa M, Musumeci M, Scuto A, Musumeci, Malaguarnera L. Effect of interferon-g, interleukin-10, lipopolysaccharide and tumor necrosis factor-a on chitotriosidase synthesis in human macrophages. *Clin Chem Lab Med* 2005;43(5):499-502.
10. Grace ME, Balwani M, Nazarenko I, Prakash-Cheng, Desnick RJ. Type 1 Gaucher disease: null and hypomorphic novel chitotriosidase mutations-implications for diagnosis and therapeutic monitoring. *Hum Mutat* 2007;28(9):866-873.
11. Piras I, Melis A, Ghiani ME, Falchi A, Luiselli D, Moral P, et al. Human CHIT1 gene distribution: new data from Mediterranean and European populations. *J Hum Genet* 2007;52(2):110-116.
12. Fusetti F, von Moeller H, Houston D, Rozeboom H, Dijkstra B, Boot RG, et al. Structure of human chitotriosidase. Implications for specific inhibitor design and function of mammalian chitinase-like lectins. *J Biol Chem* 2002;277(28):25537-25544.
13. Rodrigues MR, Sá Miranda MC, Amaral O. Allelic frequency determination of the 24-bp chitotriosidase duplication in the Portuguese population by real-time PCR. *Blood Cells Mol Dis* 2004;33(3):362-364.
14. Miller SA, Dykes DD, Polesky HF. A simple salting out procedure for extracting DNA from human nucleated cells. *Nucleic Acids Res* 1988;16(3):1215.
15. Sambrook J, Russell DW. *Molecular cloning a laboratory manual*. Vol. III. Third edition. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press; 2001.
16. Sanguinetti CJ, Dias Neto E, Simpson AJ. Rapid silver staining and recovery of PCR products separated on polyacrylamide gels. *Biotechniques* 1994;17(5):914-921.