



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL ESTADO
DE MORELOS FACULTAD DE MEDICINA
SECRETARÍA DE INVESTIGACIÓN
SECRETARÍA ACADÉMICA
JEFATURA DE POSGRADO



“Polimorfismos de un solo nucleótido en el dominio de unión al ADN del gen que codifica al factor de transcripción CEBP α y su frecuencia en voluntarios de 18 a 25 años con sobrepeso u obesidad del Estado de Morelos”

TESIS

PARA OBTENER EL GRADO DE MAESTRA EN MEDICINA MOLECULAR

QUE PRESENTA

L.F MELISSA HERNÁNDEZ URIBE

DIRECTOR DE TESIS: DR. JESÚS SANTA-OLALLA TAPIA

Cuernavaca, Morelos, México, 12 de octubre de 2021

Miembros del Comité Tutorial:

Tutor principal: Dr. Jesús Santa Olalla Tapia

Tutor personal: Dr. Juan José Acevedo Fernández

1° vocal: Dra. Alma Ethelia López Caudana

2° vocal: Dra. Gabriela Castañeda Corral

3° vocal: Dr. Fernando Esquivel Guadarrama

Miembros del Jurado de Examen:

Presidente: Dr. Fernando Esquivel Guadarrama

Secretario: Dra. Gabriela Castañeda Corral

1° vocal: Dr. Ernesto Rodríguez Ayala

2° vocal: Dra. Alma Ethelia López Caudana

3° vocal: Dr. Jesús Santa Olalla Tapia

Lugar en donde se realizó la tesis:

Cuernavaca, Morelos, octubre de 2021

Laboratorio 11 de Biología de Células Troncales de la Facultad de Medicina de la
Universidad Autónoma del Estado de Morelos.

Fuente de financiamiento:



No. De becario

963197

Proyecto de tesis vinculado a:

Estudio GEMM (Genética de las Enfermedades Metabólicas en México): Bases Genómicas
del Metabolismo Postprandial.



FACULTAD DE MEDICINA

Secretaría de Investigación

Coordinación General de Posgrado

Cuernavaca, Mor., 19 de agosto de 2021.

Dra. Vera Lucia Petricevich

Directora

Facultad de Medicina

Presente:

Estimada Dra. Petricevich, por este conducto me permito informarle que he revisado el trabajo de Tesis "Polimorfismos de un solo nucleótido en el dominio de unión al ADN del gen que codifica al factor de transcripción CEBP α y su frecuencia en voluntarios de 18 a 25 años con sobrepeso u obesidad del Estado de Morelos", que para obtener el grado de Maestra en Medicina Molecular me proporcionó la alumna Melissa Hernández Uribe. Le comunico que su contenido es adecuado y suficiente, por lo que de acuerdo al artículo 75 del Reglamento General de Estudios de Posgrado de la UAEM le otorgo el siguiente dictamen:

I. Se aprueba el trabajo de tesis otorgando el voto correspondiente.

Así mismo, le agradezco la invitación a participar en este programa educativo, reiterando además mi disposición para seguir colaborando en este tipo de actividades. Sin otro particular por el momento, reciba un cordial saludo.

Atentamente

Dr. Fernando Roger Esquivel Guadarrama

Calle Loferos esquina Ixtacchuatl s/n Col. Volcanes. C.P. 62950. Cuernavaca, Morelos, México.
Tel. (777)3 29-3473 • ijstura_posgrado.medicina@uasom.mx

**UA
EM**

Una universidad de excelencia

RECTORÍA
2017-2022



Se expide el presente documento firmado electrónicamente de conformidad con el ACUERDO GENERAL PARA LA CONTINUIDAD DEL FUNCIONAMIENTO DE LA UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL ESTADO DE MORELOS DURANTE LA EMERGENCIA SANITARIA PROVOCADA POR EL VIRUS SARS-COV2 (COVID-19) emitido el 27 de abril del 2020.

El presente documento cuenta con la firma electrónica UAEM del funcionario universitario competente, amparada por un certificado vigente a la fecha de su elaboración y es válido de conformidad con los LINEAMIENTOS EN MATERIA DE FIRMA ELECTRÓNICA PARA LA UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE ESTADO DE MORELOS emitidos el 13 de noviembre del 2019 mediante circular No. 32.

Sello electrónico

FERNANDO ROGER ESQUIVEL GUADARRAMA | Fecha:2021-10-12 10:10:06 | Firmante
 BbnkdQmki8wqXkPyCah8LJZDgXaB8ugudOLqVQZ3gY0qZnZ0ApLylrOa9mR9kWAbrnfpwveGaQRdMALpdDazr7wwTjwKvVj4E231eb3yvc7Jb8hPaAcAV9K0V1IG25F
 e8e3qOIH7H8BbnKaADGKzrVhY8uQPhcR8ekY4wh0H1Au7Z8MchKzavvcZR+Z3bDQZ7XOvO8KZpAuAJkAFeVqHhAMIGQZgoYn8+98FV3hVnTL8kLUP8OOvxdg96
 wZ3uYQ3FOvVqjCHUC8MPRN8qM83bepHoo8rOvNAaUba9kTaliaPumEoQVhve==

Puede verificar la autenticidad del documento en la siguiente dirección electrónica o
 escaneando el código QR ingresando la siguiente clave:



[GruAFVtcq8](#)

<https://sirma.uaem.mx/hoRepuolo/SMSQqsK3iZRON+4QWWT3N64uEpRX>



Una universidad de excelencia

RECTORÍA
2017-2023



FACULTAD DE MEDICINA

Secretaría de Investigación

Coordinación General de Posgrado

Cuernavaca, Mor., 19 de agosto de 2021.

Dra. Vera Lucia Petricevich
Directora
Facultad de Medicina
P r e s e n t e:

Estimada Dra. Petricevich, por este conducto me permito informarle que he revisado el trabajo de Tesis "Polimorfismos de un solo nucleótido en el dominio de unión al ADN del gen que codifica al factor de transcripción CEBP α y su frecuencia en voluntarios de 18 a 25 años con sobrepeso u obesidad del Estado de Morelos", que para obtener el grado de Maestra en Medicina Molecular me proporcionó la alumna Melissa Hernández Uribe. Le comunico que su contenido es adecuado y suficiente, por lo que de acuerdo al artículo 75 del Reglamento General de Estudios de Posgrado de la UAEM le otorgo el siguiente dictamen:

I. Se aprueba el trabajo de tesis otorgando el voto correspondiente.

Así mismo, le agradezco la invitación a participar en este programa educativo, reiterando además mi disposición para seguir colaborando en este tipo de actividades. Sin otro particular por el momento, reciba un cordial saludo.

A t e n t a m e n t e

Dra. Gabriela Castañeda Corral

Calle Lafontes esquina Ixtacohuatl s/n Col. Volcanes, C.P. 62350. Cuernavaca, Morelos, México.
Tel. (777)3 29-3473 • jolisluna_posgrado.medicina@uaem.mx

**UA
EM**

Una universidad de excelencia

RECTORÍA
2017-2023



Se expide el presente documento firmado electrónicamente de conformidad con el ACUERDO GENERAL PARA LA CONTINUIDAD DEL FUNCIONAMIENTO DE LA UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL ESTADO DE MORELOS DURANTE LA EMERGENCIA SANITARIA PROVOCADA POR EL VIRUS SARS-COV2 (COVID-19) emitido el 27 de abril del 2020.

El presente documento cuenta con la firma electrónica UAEM del funcionario universitario competente, amparada por un certificado vigente a la fecha de su elaboración y es válido de conformidad con los LINEAMIENTOS EN MATERIA DE FIRMA ELECTRÓNICA PARA LA UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE ESTADO DE MORELOS emitidos el 13 de noviembre del 2019 mediante circular No. 32.

Sello electrónico

GABRIELA CASTAÑEDA CORRAL | Fecha:2021-10-21 14:12:35 | Firmante
 sBACNjYwYmsCgYxonMkuKkEpZmBNMqpmICr+VLSVcDsgLoErbC9nCUoIy3dkia5Do+WhVv-rjHu6eB+DP6daIXLrcRdeHSDXFr34mbb2zR55eIly2N2WQIhWWE5pEIk
 DVIYQz25UJy6R8vnnSFD4dteuL5gr7+DE8E0e7qHC8upX3QeRo2w78vLa8E8eZuJWMMVEZHLUwAeZrH83mVz9+oIYqWNaqjnRorcTksOGjVv4tdW6ZReCqApK5
 kG/QwXpLGe36Z1HjueET+yVnGknRTZVhPzDzZofAlemvd8rChwCKweXgQaa9u**

Puede verificar la autenticidad del documento en la siguiente dirección electrónica o
 escaneando el código QR ingresando la siguiente clave:



nXmpz96M

<https://e8ma.uaem.mx/Reputio/DoCrYIqLQ5e5oo7juIIta6RPgBd9>



Una universidad de excelencia

RECTORÍA
 2017-2023



Cuernavaca, Mor., 19 de agosto de 2021.

Dra. Vera Lucia Petricevich
Directora
Facultad de Medicina
Presente:

Estimada Dra. Petricevich, por este conducto me permito informarle que he revisado el trabajo de Tesis "Polimorfismos de un solo nucleótido en el dominio de unión al ADN del gen que codifica al factor de transcripción CEBP α y su frecuencia en voluntarios de 18 a 25 años con sobrepeso u obesidad del Estado de Morelos", que para obtener el grado de Maestra en Medicina Molecular me proporcionó la alumna Melissa Hernández Uribe. Le comunico que su contenido es adecuado y suficiente, por lo que de acuerdo al artículo 75 del Reglamento General de Estudios de Posgrado de la UAEM le otorgo el siguiente dictamen:

I. Se aprueba el trabajo de tesis otorgando el voto correspondiente.

Así mismo, le agradezco la invitación a participar en este programa educativo, reiterando además mi disposición para seguir colaborando en este tipo de actividades. Sin otro particular por el momento, reciba un cordial saludo.

A t e n t a m e n t e

Dr. Ernesto Rodríguez Ayala



Se expide el presente documento firmado electrónicamente de conformidad con el ACUERDO GENERAL PARA LA CONTINUIDAD DEL FUNCIONAMIENTO DE LA UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL ESTADO DE MORELOS DURANTE LA EMERGENCIA SANITARIA PROVOCADA POR EL VIRUS SARS-COV2 (COVID-19) emitido el 27 de abril del 2020.

El presente documento cuenta con la firma electrónica UAEM del funcionario universitario competente, amparada por un certificado vigente a la fecha de su elaboración y es válido de conformidad con los LINEAMIENTOS EN MATERIA DE FIRMA ELECTRÓNICA PARA LA UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE ESTADO DE MORELOS emitidos el 13 de noviembre del 2019 mediante circular No. 32.

Sello electrónico

ERNESTO RODRIGUEZ AYALA | Fecha:2021-10-21 09:50:37 | Firmante
Ddog1eTyTskzyE+IWGjB+DeTEx+cZ2oTGDh87yOUMT9OquCenTkoVnGyYK2000Y306MweJMPICJcJFoj6U5/PGQ4SLV1AJDgNq1DjYdHfPncqY4Uv5zL8VvoO3Vt6A
RuSD06dWTW6E00baZvHLLjThGcR9XjSUF4qmIWE+XgAggpdagsov2095tmCabllkoDkZged8AupohT48gRpoTTADW8KXKh8M2mEa7v8O0HQuf50M5u8u8taHqGope
862XV6SL4mPXNQCacuTD3RWDe+ARa3ZNIPOqNADELVLcZjcoOnY0E9FojUEaPnDyC**



Puede verificar la autenticidad del documento en la siguiente dirección electrónica o
escaneando el código QR ingresando la siguiente clave:

709wOpT8M

<https://firma.uaem.mx/hoRepuolo/Nk5YVIGZ0009Yk6RP6Tqny7d6AR1g>



Una universidad de excelencia

RECTORÍA
2017-2023



FACULTAD DE MEDICINA

Secretaría de Investigación

Coordinación General de Posgrado

Cuernavaca, Mor., 19 de agosto de 2021.

Dra. Vera Lucia Petricevich
Directora
Facultad de Medicina
P r e s e n t e:

Estimada Dra. Petricevich, por este conducto me permito informarle que he revisado el trabajo de Tesis "Polimorfismos de un solo nucleótido en el dominio de unión al ADN del gen que codifica al factor de transcripción CEBPa y su frecuencia en voluntarios de 18 a 25 años con sobrepeso u obesidad del Estado de Morelos", que para obtener el grado de Maestra en Medicina Molecular me proporcionó la alumna Melissa Hernández Uribe. Le comunico que su contenido es adecuado y suficiente, por lo que de acuerdo al artículo 75 del Reglamento General de Estudios de Posgrado de la UAEM le otorgo el siguiente dictamen:

I. Se aprueba el trabajo de tesis otorgando el voto correspondiente.

Así mismo, le agradezco la invitación a participar en este programa educativo, reiterando además mi disposición para seguir colaborando en este tipo de actividades. Sin otro particular por el momento, reciba un cordial saludo.

A t e n t a m e n t e

Dra. Alma Ethelia López Caudana

Calle Loferos esquina Iztaocihuatl s/n Col. Volcanes. C.P. 62350. Cuernavaca, Morelos, México.
Tel. (777)3 29-3473 • platura_posgrado.medicina@uam.mx



Una universidad de excelencia

RECTORÍA
2017-2023



Se expide el presente documento firmado electrónicamente de conformidad con el ACUERDO GENERAL PARA LA CONTINUIDAD DEL FUNCIONAMIENTO DE LA UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL ESTADO DE MORELOS DURANTE LA EMERGENCIA SANITARIA PROVOCADA POR EL VIRUS SARS-COV2 (COVID-19) emitido el 27 de abril del 2020.

El presente documento cuenta con la firma electrónica UAEM del funcionario universitario competente, amparada por un certificado vigente a la fecha de su elaboración y es válido de conformidad con los LINEAMIENTOS EN MATERIA DE FIRMA ELECTRÓNICA PARA LA UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE ESTADO DE MORELOS emitidos el 13 de noviembre del 2019 mediante circular No. 32.

Sello electrónico

ALMA ETHELJA LÓPEZ CAUDANA | Fecha:2021-08-31 18:06:58 | Firmante
OylMDkPAo3ygrlbFbapcDN55bAvzJ5+V7hg7Rj)j9kVUkzHG55E5G.JnuDcy23uA11Ayn2CjWVQCmR83WpnuvDCEHfRZvurmkdIAHwVWTrIowd7+VWfPimpDeBkFgKOC
5ogovV3n3gVWUdDubfnHemV6ghKzpdCR9wEdYKaUoD1DUhVWfVudCod9nrficz2CdMMWbKk8D7oLM5QDUkK3mU1vepo5g+V7WwNDooV9TXFUDGdonwtoQbauDLmD
1+OAb7qwGkCqNoz2Nn159eH+HemF6b+JnFlwTqvqTAczMkVzPap2CT3puA768QhGDiIevQ**



Puede verificar la autenticidad del documento en la siguiente dirección electrónica o
escaneando el código QR ingresando la siguiente clave:

7JfR2P

<https://efirma.uaem.mx/noReputio/8Nuba2433bbFCbnPqx25dAQVFXQ6>



AGRADECIMIENTOS

No fue un camino sencillo, hubo demasiadas complicaciones en la creación de esta tesis, pero finalmente se logró el final de este camino.

En primera instancia quiero agradecer a la Facultad de Medicina y al posgrado de Medicina Molecular por permitirme pertenecer a este bonito posgrado.

Le agradezco infinitamente al Dr. Jesús Santa Olalla por abrirme las puertas de su laboratorio y estar al pendiente de mi formación por estos dos años, que a pesar de que ya no se encuentre en este mundo le estaré eternamente agradecida por todos los conocimientos que me brindo, por todo el apoyo tanto moral como académico que dio, y que siempre estuvo cuando lo necesitaba.

Les agradezco enormemente a todo mi comité tutorial y revisor de tesis, que desde el inicio estuvo pendiente de mi formación y de que todo todas las metas se cumplieran. Muchas gracias a la Dra. Alma López, Dra. Gabriela Castañeda, Dr. Fernando Esquivel, Dr. Juan José Acevedo y al Dr. Ernesto Rodríguez. Les agradezco cada una de las sugerencias que me dieron en la realización de esta tesis y su apoyo en todo momento.

Agradezco a CONACYT por permitirme realizar esta tesis y maravillarme de la ciencia, que a pesar de que muchas veces quise renunciar, siempre ha sido lo que más me ha gustado hacer.

Por otro lado, quisiera agradecer a todos mis compañeros de laboratorio, los días con ellos se pasaban mejores. Agradezco enormemente a Laura y a Gueorgui que siempre me escucharon y me apoyaron en cuanto tenía dificultades

Gracias a mi pareja Jesús Rivera por siempre estar ahí, por sus consejos, su apoyo y por ayudarme a buscar alternativas cuando las cosas no me salían.

Esta tesis la dedico a mis papás Guillermo y Margarita, y a mi hermano Guillermo, que siempre me han apoyado en cada una de mis decisiones, jamás me han limitado en ninguno de mis sueños y que en donde quiera que vaya ellos van, Gracias por siempre estar conmigo y por todo el apoyo y el amor que me dan.

ÍNDICE

ÍNDICE DE FIGURAS	16
ÍNDICE DE TABLAS	17
ABREVIATURAS	18
1. RESUMEN	20
2. INTRODUCCIÓN	21
2.1 Aspectos clínicos	21
2.1.2 Clasificación de sobrepeso y obesidad	22
2.1.3. Complicaciones del sobrepeso y la obesidad	22
2.1.4. Riesgo cardiovascular	23
2.2 Epidemiología	24
2.2.1 Sobrepeso y obesidad en el mundo	24
2.2.2. Sobrepeso y obesidad en México	24
2.2.3. Sobrepeso y obesidad en Morelos y el centro del país	24
2.3. Fisiopatología de la obesidad.	25
2.3.1 Tejido adiposo blanco	27
2.3.2 Tejido adiposo marrón	27
2.3.3. Tejido adiposo beige	29
2.4. Adipogénesis	29
2.4.1 Hipertrofia	30
2.4.2 Hiperplasia	31
2.5 Factores que propician sobrepeso y obesidad	31
2.6 Genes implicados en la obesidad	31
2.7 Polimorfismos de un solo nucleótido	33
2.7.1. SNPs relacionados con la obesidad en población mexicana	34
2.8 Familia CEBP	34
2.9 Organización, patrón de expresión y función de CEBPα	39
2.9.1 Participación de CEBPα en la adipogénesis	40
2.9.2 Participación de CEBPα en el adipocito maduro	41
2.9.3 Interacción con otros factores de transcripción en adipogénesis	43
2.10 Antecedentes	44
2.10.1 SNP en CEBPα	44
2.10.2 Estudios previos del laboratorio de biología de células trocales.	49

3. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA	52
4. HIPÓTESIS	54
5.OBJETIVOS	55
5.1 Objetivo general	55
5.2 Objetivos particulares	55
6. MATERIAL Y MÉTODOS	56
6.1. Tipo de estudio	56
6.2 Criterios de inclusión, exclusión y eliminación.....	56
6.2.1.Criterios de inclusión.....	56
6.2.2. Criterios de exclusión	56
6.2.3. Criterios de eliminación	56
6.3 Población de estudio.....	56
6.4 Lugar de obtención de las muestras.....	57
6.5 Lugar de estudio	58
6.6. Periodo de estudio	58
6.7 Definición de las variables del estudio.....	59
6.8 Procedimientos de laboratorio	61
6.8.1 Purificación de ADN por medio del método fenol-cloroformo	61
6.8.2 Evaluación de la concentración de ADN y de la pureza	61
6.8.3 Integridad del ADN	62
6.8.4 Evaluación de la amplificación: PCR.....	62
6.8.5 Diseño de oligonucleótidos	63
6.8.6. Estandarización de oligonucleótidos en PCR punto final	64
6.8.7 PCR punto final de las muestras.....	68
6.8.8 Purificación del producto de PCR.	68
6.8.9 Determinación del tamaño del producto de PCR purificado.	69
6.8.10 Secuenciación	69
6.8.11 Evaluación de la calidad de la secuencia.....	69
6.8.12 Alineamiento de secuencias con del dominio de unión a ADN del gen CEBP α	70
6.8.13 Alineamiento múltiple de las secuencias de nucleótidos.....	70
6.8.14 Predictor de daño a la estructura y función de la proteína.....	70
6.9 Análisis Estadístico	71
7. ASPECTOS ÉTICOS	72
8. RECURSOS	73

8.1 Recursos humanos	73
8.2 Recursos materiales	73
8.3 Recursos financieros.....	74
9. RESULTADOS	75
9.1 Población de estudio.....	75
9.2 Evaluación de la concentración de ADN y pureza.....	76
9.3. Evaluación de la amplificación: PCR.....	77
9.4 Estandarización de PCR.....	78
9.5. PCR punto final de las muestras.....	79
9.6 Purificación del producto de PCR.....	80
9.7. Determinación del tamaño del producto de PCR purificado.....	81
9.8. Secuenciación.....	82
9.9. Evaluación de la calidad de la secuencia.....	82
9.10. Alineamiento de secuencias con BLAST.....	84
9.11 Alineamiento múltiple de las secuencias.....	84
9.11.1 Sitio de unión al ADN.....	85
9.11.2. Resto de la secuencia.....	86
9.12 Predictor de daño a la estructura y función de la proteína.....	88
9.12.1. Sitio de unión al ADN.....	89
9.12.2. Resto de la secuencia.....	91
10. DISCUSIÓN	93
11. FORTALEZAS Y LIMITACIONES	97
12. CONCLUSIONES	98
13. PERSPECTIVAS	99
14. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	100
15. ANEXOS	110
Anexo I. Consentimiento informado. Base de datos B.....	110
Anexo II. Consentimiento informado. Base de datos D.....	114
Anexo III. Consentimiento informado. Base de datos E.....	117
Anexo IV. SNPs encontrados en el sitio de unión al ADN por voluntario.....	122
Anexo V. SNPs encontrados en el resto de la secuencia por voluntario.....	123

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Diferenciación de los adipocitos blancos, marrones y beige.	28
Figura 2. Estructura de CEBP β	35
Figura 3. Representación del gen de la familia de los CEBPs.	37
Figura 4. Representación esquemática de los dominios de la proteína CEBP α	40
Figura 5. Trabajos previos en donde se han utilizado las muestras del Biobanco	58
Figura 6. Porcentaje de hombres y mujeres presentes en la población estudiada	75
Figura 7. Distribución de sobrepeso y obesidad en la población de estudio.	76
Figura 8. Gel de agarosa al 2% de productos de amplificación con el kit comercial Pwo SuperYield DNA Polymerase, dNTPack.....	79
Figura 9. Productos de PCR punto final del gen CEBP α a partir de muestras de ADN de la base de datos B.	80
Figura 10. Gel de agarosa de productos de purificación de PCR del gen CEBP α	82
Figura 11. Electroferograma de la secuencia D-UDMM-075.....	83
Figura 12. Ejemplo del alineamiento de una secuencia con la secuencia de referencia	84
Figura 13. Alineamiento múltiple del sitio de unión al ADN de 31 muestras	85
Figura 14. Alineamiento múltiple del resto de la secuencia de 31 muestras	87

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Valores de IMC con respecto al estado nutricional según la OMS	22
Tabla 2. Perfil de expresión de las proteínas de la familia CEBPs.....	38
Tabla 3. SNPs de CEBP α en componentes del síndrome metabólico	46
Tabla 4. SNPs encontrados en el sitio de transactivación de PPAR γ	49
Tabla 5. SNPs encontrados en el gen PPAR γ de voluntarios sanos de 18 a 20 años	50
Tabla 6. SNPs encontrados en el exón 3 de PPAR γ	51
Tabla 7. Bases de datos utilizadas para el proyecto.....	57
Tabla 8. Variables del estudio	59
Tabla 9. Reactivos utilizados en PCR semicuantitativo de GAPDH	62
Tabla 10. Oligonucleótidos diseñados para el sitio de unión al ADN del gen CEBP α	64
Tabla 11. Curva de estandarización de los oligonucleótidos para obtener las condiciones óptimas para la amplificación por PCR punto final de ADN	65
Tabla 12. Combinaciones y aditivos utilizados para estandarización de la amplificación por PCR utilizando diferentes oligonucleótidos.	66
Tabla 13. Mix del Kit Pwo SuperYield DNA Polymerase, dNTPack de Roche.....	67
Tabla 14. Nomenclatura IUPAC para nucleótidos	70
Tabla 15. Recursos materiales	73
Tabla 16. Recursos financieros.....	74
Tabla 17. Valores de IMC por sexo.....	76
Tabla 18. Pureza y contaminación de muestras.....	77
Tabla 19. Pureza y contaminación de muestras purificadas del proyecto.	81
Tabla 20. Calidad de las secuencias QV.....	83
Tabla 21. SNPs encontrados en el sitio de unión al ADN, del gen CEBP α	86
Tabla 22. SNPs encontrados en el resto de la secuencia del gen CEBP α	88
Tabla 23. Predicción de daño de la proteína de los SNPs encontrados en el sitio de unión al ADN	90
Tabla 24. Predicción de daño de la proteína de los SNPs encontrados en el resto de la secuencia.....	92

ABREVIATURAS

ABCA1	Miembro 1 de la subfamilia de transportadores ABCA
ADD1	Alfa-aducina
ADIPOQ	Adiponectina
ADN	Ácido desoxirribonucleico
AMPc	adenosín monofosfato cíclico
BDNF	Factor neurotrófico derivado del cerebro
bHLH	Hélice-bucle-hélice básica
BLAST	Herramienta básica de búsqueda de alineación local
BMP7	Proteína morfogenética de hueso 7
bZIP	Dominio básico de cremallera de leucinas
CAD	Enfermedad de las arterias coronarias
CEBPs	CCAAT proteína de unión al potenciador.
CEBP α	CCAAT proteína de union al potenciador alfa
CEBP β	CCAAT proteína de union al potenciador beta
CEBP γ	CCAAT proteína de union al potenciador gamma
CEBP δ	CCAAT proteína de union al potenciador delta
CEBP ϵ	CCAAT proteína de union al potenciador epsilon
CEBP ζ	CCAAT proteína de union al potenciador zeta
EBF2	Factor temprano 2 de células B
ENPP1	Ectonucleótido pirofosfatasa / fosfodiesterasa 1
ENSANUT	Encuesta Nacional de Salud y Nutrición
ETV5	Factor de transcripción variante de ETS 5
FAIM2	Molécula inhibidora apoptótica 2 de Fas
FOXC2	Caja de horquilla C2
FOXO1	Proteína de caja Forkhead O1
FTO	Proteína asociada a la masa grasa y la obesidad,
GAPDH	Gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa
GNPDA2	Glucosamina-6-fosfato desaminasa 2
GWAS	Estudio de asociación de genoma completo
HDL	Lipoproteínas de alta densidad
HIF1 α	Factor 1-alfa inducible por hipoxia
IGFs	Factores de crecimiento insulínico
IL-4	Interleucina 4
IL-6	Interleucina 6
IL-8	Interleucina 8
IMC	Índice de masa corporal
ISSSTE	Instituto de seguridad y servicios sociales de los trabajadores del estado
KCTD15	Dominio de tetramerización de canales de potasio 15
KLF	Factores de transcripción similar a Krüppel
MAPK	Proteína cinasas activadas por mitógenos
MC4R	Receptor 4 de la melanocortina
MCP-1	Proteína quimio atrayente de monocitos 1

MTCH2	Portador mitocondrial homólogo 2
MYF5	Factor miogénico 5
NCBI	Centro Nacional de biotecnología
NEGR1	Regulador de crecimiento neuronal 1
OMS	Organización mundial de la salud
PAX7	Proteína de caja emparejada 7
PCSK1	Proproteína convertasa 1
PGC-1 α	Coactivador de receptor gamma activado por proliferador de peroxisoma 1 alfa
PPAR	Receptores activados por proliferadores de peroxisoma
PPAR α	Receptores activados por proliferadores de peroxisoma alfa
PPAR γ	receptores activados por proliferadores de peroxisoma gamma
PRDM10	Proteína de dedo de zinc de dominio PR 10
PRDM16	Proteína de dedo de zinc de dominio PR 16
RIP140	Proteína 1 que interactúa con el receptor nuclear
SEC16B	SEC16 Homólogo B, factor de exportación del retículo endoplásmico
SH2B1	Proteína adaptadora SH2B 1
SIRT1	Sirtuina 1
SNP	Polimorfismos de un solo nucleótido
SRC1	Coactivador de receptor nuclear 1
SREBP-1C	Proteína de unión a elementos reguladores de esteroles 1
STAT1	Transductor de señal y activador de transcripción 1
STAT3	Transductor de señal y activador de transcripción 3
STAT5	Transductor de señal y activador de transcripción 5
TCF7L2	Factor de transcripción 7 similar a 2
TIF2	Coactivador de receptor nuclear 2
TMEM18	Proteína transmembrana 18
TNF- α	Factor de necrosis tumoral alfa
UCP1	Proteína de desacoplamiento 1
ZFP516	Proteína de dedos de zinc 516

1. RESUMEN

Introducción: El sobrepeso y la obesidad son problemas de salud pública mundial. La obesidad trae consigo complicaciones que disminuyen la calidad de vida del individuo. Entre las complicaciones más importantes están la hipertensión, diabetes mellitus, dislipidemias, problemas cardiovasculares y cáncer. La obesidad es una enfermedad multigénica, en la que para que se produzca intervienen múltiples variantes alélicas de genes. En este contexto, existe evidencia de que distintos polimorfismos de un solo nucleótido (SNP) se han asociado con índices de masa corporal (IMC) más altos. CEBP α es un factor de transcripción que interviene en la homeostasis energética debido a que tiene genes blanco importantes para la regulación energética como son el gen de la adiponectina, leptina y gen FTO. **Objetivo:** Identificar nuevos SNPs en el dominio de unión al ADN del gen que codifica a CEBP α en voluntarios de 18 a 25 años con sobrepeso y obesidad residentes del estado de Morelos. **Métodos:** Se incluyeron muestras de sangre de 31 voluntarios recolectados tanto del banco de sangre del hospital ISSSTE de Cuautla como de estudiantes de la Facultad de Medicina de la UAEM. El ADN de las muestras se obtuvo por medio del método fenol-cloroformo para ser amplificado posteriormente por PCR punto final. Para la amplificación se diseñaron 3 pares de oligonucleótidos que abarca el sitio de unión al ADN del gen CEBP α . Para realizar la PCR se utilizó el kit comercial *Pwo SuperYield DNA Polymerase, dNTPack de Roche*. Los productos de PCR fueron posteriormente purificados, secuenciados por el método de Sanger y analizadas con los programas *CLC viewer 8* y *Sequence Scanner v.2* para la identificación de SNP. Se realizó un análisis estadístico de tipo descriptivo de los parámetros de edad e IMC utilizando *Excel 360*. **Resultados:** El 58% de la población de estudio fueron mujeres y 42% hombres, la media de edad fue 20.2 (DE \pm 1.8) años, la media de IMC 28.7 (DE \pm 3.0) kg/m². Se encontraron 14 SNP en el sitio de unión al ADN del gen CEBP α de los cuales 9 no han sido reportados. La frecuencia de los SNP se encontró en un rango de 3.22 a 19.35%. El SNP de mayor frecuencia (19.35%) fue el G5907T. Según la predicción de daño en el sitio de unión al ADN de CEBP α hay 4 SNP sinónimos y 5 SNP que posiblemente son dañinos. **Conclusión:** Se encontraron 14 nuevos SNP en el sitio de unión al ADN de CEBP α de voluntarios jóvenes con sobrepeso y obesidad que residen en el estado de Morelos.

2. INTRODUCCIÓN

El sobrepeso y la obesidad son problemas de salud pública mundial. Cada día hay más obesos en el mundo y se estima que las cifras seguirán en aumento. La obesidad trae consigo complicaciones que hacen que la calidad de vida del individuo se vea deteriorada; entre las complicaciones importantes están el aumento de la presión arterial, diabetes mellitus, dislipidemias, problemas cardiovasculares y cáncer.¹

La obesidad es una enfermedad multifactorial, en la que se suman los factores sociales, psicológicos y genéticos.² Es una enfermedad multigénica, en la que intervienen múltiples variantes alélicas de genes para que se produzca; se han acumulado evidencias de que distintos polimorfismos de un solo nucleótido (SNP) han presentado asociación con índices de masa corporal más altos.³

CEBP α (CCAAT proteína de unión al potenciador alfa) es un factor de transcripción que interviene en la diferenciación del adipocito, además de ser un factor de transcripción importante que regula la expresión de la adiponectina⁴, leptina⁵ y el gen asociado a la obesidad (FTO)⁶, por lo que se considera un buen gen candidato para estudiar polimorfismos de un solo nucleótido. Además, no se han hecho estudios en mexicanos para conocer si existen SNPs que puedan estar relacionados al sobrepeso u obesidad.

2.1 Aspectos clínicos

2.1.1 Definición de sobrepeso y obesidad

El sobrepeso y la obesidad son trastornos nutricionales que se deben a un desequilibrio entre la ingesta de alimentos y el gasto energético.⁷ La Organización Mundial de la Salud (OMS) la define como una acumulación anormal o excesiva de tejido adiposo que es perjudicial para la salud⁸ y la Norma Oficial Mexicana 008, que tiene como objetivo el tratamiento integral del sobrepeso y la obesidad, define a la obesidad como la enfermedad caracterizada por el exceso de tejido adiposo en el organismo, y al sobrepeso como la condición de aumento de masa corporal a expensas de la acumulación excesiva de grasa que supone un riesgo para la obesidad.⁹

2.1.2 Clasificación de sobrepeso y obesidad

El sobrepeso y la obesidad se pueden clasificar con base en el IMC indicador que relaciona el peso corporal con la talla. En la tabla 1 se muestra la relación entre el estado nutricional y el IMC.

Tabla 1. Valores de IMC con respecto al estado nutricional según la OMS

IMC (kg/m ²)	ESTADO NUTRICIONAL
Por debajo de 18.5	Bajo peso
18.5-24.9	Peso normal
25.0-29.9	Pre-obesidad (sobrepeso)
30.0-34.9	Obesidad tipo I
35.0-39.9	Obesidad tipo II
Por encima de 40	Obesidad tipo III

Según la OMS, el diagnóstico de sobrepeso se establece cuando una persona tiene un IMC de 25 a 29.9 kg/m², mientras que la obesidad se clasifica en tres tipos, el tipo I, que se define cuando se tiene un IMC de 30 a 34.9 kg/m²; obesidad tipo II cuando el individuo presenta un IMC de 35 a 39.9 kg/m² y obesidad tipo III, cuando el individuo presenta un IMC igual o mayor de 40 kg/m², a la cual también se le conoce como obesidad mórbida.¹⁰

2.1.3. Complicaciones del sobrepeso y la obesidad

Existen múltiples complicaciones del sobrepeso y la obesidad. Algunas de estas se describen a continuación. Por ejemplo, hay múltiples estudios que determinan que el sobrepeso y la obesidad son el principal factor predictivo para desarrollar diabetes mellitus tipo 2.¹¹

La hipertensión arterial es otra complicación importante del sobrepeso y la obesidad, se han realizado estudios en donde se asoció positivamente el IMC con la hipertensión,¹ y se ha descrito que tiene una relación casi lineal con los valores de presión arterial.¹¹

Las dislipidemias son otra de las complicaciones del sobrepeso y de la obesidad, incluyen la reducción de la lipoproteína de alta densidad (HDL)¹² y el aumento de colesterol y triacilglicéridos.^{1,11}

El sobrepeso y la obesidad también pueden traer trastornos ventilatorios como la apnea obstructiva del sueño, lo que puede ser por efecto de compresión directa del tejido graso en la vía aérea. El asma también puede ser otra patología que se agrava por esta condición ya que se puede presentar mayor prevalencia de asma en personas obesas; 75% de las personas que tienen emergencias asmáticas son obesas o con sobrepeso.¹

La obesidad y la resistencia a la insulina también se han asociado con enfermedades que afectan la reproducción como el síndrome de ovario poliquístico caracterizado por anovulación e hiperandrogenismo¹¹; también pueden ocurrir complicaciones durante el embarazo y el parto como diabetes gestacional, macrosomía y distocias.¹ En hombres, la obesidad se ha asociado con infertilidad al reducir el número de espermias y su movilidad, además de aumentar la tasa de disfunción eréctil.¹¹

También existen evidencias de que la obesidad se asocia a distintos tipos de cáncer como el de esófago, útero, glándula mamaria, riñón, vesícula biliar, colon y tiroides.¹¹

2.1.4. Riesgo cardiovascular

Existe una gran evidencia de que hay un riesgo importante de padecer enfermedad arterial coronaria en la obesidad (CAD) en pacientes obesos. Además, en un estudio se observó, que el riesgo de desarrollar insuficiencia cardíaca llega a ser el doble en el grupo de personas obesas con respecto a las que no tienen obesidad.¹ También, existen evidencias que muestran un incremento en el riesgo de sufrir un accidente cerebrovascular hemorrágico o isquémico en pacientes masculinos que presentan obesidad. En mujeres se ha visto una relación positiva con el accidente cerebrovascular isquémico. cerebrovascular hemorrágico o isquémico en pacientes masculinos que presentan obesidad. En mujeres se ha visto una relación con el accidente cerebrovascular isquémico.¹¹

2.2 Epidemiología

2.2.1 Sobrepeso y obesidad en el mundo

El sobrepeso y la obesidad son un problema de salud pública en el mundo, de acuerdo con el reporte más reciente de la OMS se ha triplicado desde 1975 al 2016, año en que más de 1900 millones de adultos padecían sobrepeso y 650 millones eran obesos.⁸

En el año 2017, la mayor prevalencia de sobrepeso y obesidad fue en el continente americano con 63.4% y 29.0 % respectivamente; en segundo lugar, se ubicó Europa con 62.3% de sobrepeso y 25.3% de obesidad.⁸ La región con menor prevalencia fue Asia con cifras respectivas de 21.5% y 4.6%.⁸

2.2.2. Sobrepeso y obesidad en México

En la actualidad, México ocupa el segundo lugar en sobrepeso y obesidad en el mundo. Según la Encuesta Nacional de Salud y Nutrición (ENSANUT) 2018, la prevalencia de sobrepeso y obesidad en adultos mayores de 20 años fue de 39.5% y de 35.3%, respectivamente.¹³

En la ENSANUT 2018, la prevalencia de sobrepeso y obesidad en mujeres mayores de 20 años fue de 76.8% mientras que en hombres fue de 73.0%¹³. La prevalencia de obesidad fue mayor en mujeres 40.2% vs 30.5% en hombres.¹³ y sobrepeso mayor en hombres 42.5% vs 36.6% de mujeres. En mujeres desde el año 1998 al 2018 la prevalencia de sobrepeso y obesidad incrementó de 34.8% a 74.8%.¹³

2.2.3. Sobrepeso y obesidad en Morelos y el centro del país

Datos disponibles para el estado de Morelos se encuentran en la ENSANUT 2012, donde se menciona que el sobrepeso en adultos mayores de 20 años tuvo una prevalencia de 39.1% en hombres y 40.3% en mujeres; para obesidad, las prevalencias fueron 27.4% en hombres y en mujeres 32.6%.¹⁴

Según la ENSANUT 2018, en el centro del país que incluye los estados de: Puebla, Estado de México, Hidalgo, Morelos, Querétaro y Tlaxcala, la prevalencia de sobrepeso y

obesidad en adultos mayores de 20 años fue de 40.5% y de obesidad de 33% respectivamente.¹³

2.3. Fisiopatología de la obesidad.

El almacenamiento de grasa fue necesario para la supervivencia en estados de inanición, particularmente al inicio de nuestro proceso evolutivo. En la actualidad existe abundancia de alimentos y no es necesario el consumo de energía para conseguirlos (cazar o búsqueda de alimentos), y no se requiere un almacenamiento de energía, además se ingieren más calorías de las que se necesitan, lo que genera una condición muy favorable para un almacenamiento excesivo de lípidos en el tejido adiposo, lo que provoca obesidad.
15

La principal forma de almacenamiento energético se genera por los triacilgliceroles que se depositan en el tejido adiposo.¹⁶ El almacenamiento de los triacilgliceroles en los adipocitos protege contra la toxicidad de los ácidos grasos, debido a que su exceso puede favorecer su depósito en la vasculatura, donde se produce estrés oxidativo y migración de macrófagos; cuando existe un almacenamiento excesivo de ácidos grasos conduce a la liberación de estos, lo que provoca lipotoxicidad y estrés oxidativo en las mitocondrias y el retículo endoplásmico. Cuando los ácidos grasos almacenados en el adipocito son liberados inhiben la lipogénesis, lo que impide la incorporación de los triacilgliceroles al tejido adiposo y conduce a hipertrigliceridemia.¹⁵

Los adipocitos son células especializadas en almacenar los ácidos grasos en forma de triacilglicéridos y funcionan además como células endócrinas debido a que regulan varios procesos metabólicos y fisiológicos.¹⁷ Secretan varias adipocinas que desempeñan diversas funciones a través de la activación de varias vías metabólicas. Estas adipocinas pueden atravesar la barrera hematoencefálica para llegar a zonas específicas del encéfalo en donde pueden ejercer su actividad de generar la señal de saciedad, tal es el caso de la leptina. Estas adipocinas también desempeñan un papel importante en el metabolismo energético, comunican el estado nutricional, el gasto energético y la sensibilidad a la insulina.¹⁸

Los adipocitos secretan citocinas anti y proinflamatorias y algunas adipocinas que están involucradas en el metabolismo de los carbohidratos y el balance energético, como la

leptina, la adiponectina, resistina y visfatina, así como interleucina 4 (IL-4), interleucina 6 (IL-6), interferón γ y el factor de necrosis tumoral- α (TNF- α).¹⁶ Las citoquinas proinflamatorias se han implicado en la fisiopatología de las enfermedades metabólicas como las dislipidemias, diabetes mellitus tipo 2 y la enfermedad cardiovascular.¹⁹

Hay varios mecanismos de regulación endócrinos involucrados en la obesidad, el primero en ser descrito se relaciona con el gen de la leptina, el cual se descubrió en 1994. La leptina es una hormona que produce saciedad y es producida por los adipocitos. Los niveles de leptina circulantes están relacionados con el tamaño del tejido adiposo y comunican el estado del almacenamiento energético al cerebro. El ayuno disminuye los niveles de Leptina y cuando se ingieren alimentos o se tiene sobrepeso u obesidad los niveles de leptina aumentan.²⁰

Debido a que regula el peso corporal, cuando la leptina no se sintetiza de una forma adecuada se pierde la homeostasis energética y conduce a obesidad.²¹ Actualmente se han acumulado evidencias de que la resistencia a la leptina es una condición vinculada con el desarrollo de obesidad que conduce a un estado de hiperleptinemia²². La ausencia de respuesta a la leptina genera diversos problemas como la regulación de la ingesta de alimentos, del metabolismo y resistencia a la insulina. Aún no se conocen claramente los mecanismos de la resistencia a la leptina, pero se sugiere que se debe a que la leptina no llega a sus objetivos neuronales o a que se inhibe la vía de señalización dentro de las neuronas específicas ya sea por la regulación negativa del receptor de leptina o de las proteínas de señalización intracelulares.²³

La leptina puede aumentar la lipólisis y la oxidación de ácidos grasos y así disminuir la lipogénesis para reducir el tamaño de los adipocitos. Además, puede inhibir la proliferación y diferenciación de los preadipocitos. Cuando existen concentraciones bajas de leptina aumenta la proliferación de preadipocitos, sin embargo, en concentraciones más altas se inhibe la proliferación vascular tanto de preadipocitos como de estroma.²⁴ Por otra parte, la insulina aumenta la proliferación y diferenciación de preadipocitos. Existen vías de señalización que se comparten entre la leptina y la insulina como la vía de las proteínas cinasas activadas por mitógenos (MAPK), Transductor de señal y activador de transcripción 1 (STAT1) y Transductor de señal y activador de transcripción 3 (STAT3),

así la leptina al estar en concentraciones altas en el organismo activa estas vías e interfiere con la vía de señalización de la insulina, causando resistencia.²⁴

2.3.1 Tejido adiposo blanco

El tejido adiposo blanco tiene como función el almacenamiento de energía en forma de triacilglicérol. Este tipo de tejido se distribuye en todo el organismo, y existen dos tipos representativos; el visceral y el subcutáneo. El primero se distribuye alrededor de los órganos y el subcutáneo se encuentra debajo de la piel. Este tejido se caracteriza por ser de color amarillento y posee gotas grandes de lípidos.²⁵ El tejido adiposo blanco deriva del mesodermo, sus células poseen un grupo de diferenciación 24 (CD24) y receptores activados por proliferadores de peroxisoma gamma (PPAR γ)²⁶ Los factores de transcripción como la proteína 1 que interactúa con el receptor nuclear (RIP140) y el coactivador de receptor nuclear 2 (TIF2) son responsables de la adipogénesis blanca.²⁷ Su adipogénesis se genera por una cascada transcripcional que involucra varios factores de transcripción como CEBP α , PPAR γ , Proteína morfogenética de hueso 2 (BMP2) y Proteína morfogenética de hueso 4 (BMP4).²⁸

2.3.2 Tejido adiposo marrón

El tejido adiposo marrón es el encargado de la homeostasis de la temperatura corporal. Este tejido tiene un nivel mayor de mitocondrias que contienen hierro, lo que les proporciona una coloración rojo pardusco y por eso este tejido tiene un color marrón. El proceso termogénico es activado por la proteína desacopladora-1 (UCP1), que causa una fuga de protones a través de la membrana interna de la mitocondria, por lo que así se aprovecha el gradiente electroquímico para generar calor. Es un tejido ampliamente vascularizado e inervado²⁸ que se distribuye preferentemente en la zona interescapular, perirrenal, y axilar.²⁹

Los precursores de los adipocitos marrones son células mesenquimales factor miogénico 5 positivas (MYF5+) (Figura 1). La maduración de los preadipocitos marrones a los adipocitos marrones se da mediante la proteína morfogenética de hueso 7 (BMP7) y la miostatina²⁶ además que la proteína de dedo de zinc de dominio PR16 (PRDM16)

promueve la adipogénesis marrón.²⁷ PRDM16 forma un complejo transcripcional con la proteína CCAAT de unión al potenciador beta (CEBP β) este induce la expresión de PPAR γ y estimula la diferenciación de adipocitos marrones.²⁹ Estos dos factores de transcripción operan como factores críticos en el destino de tejido adiposo marrón del linaje miogénico; así que el factor miogénico 5 positivo (MYF5+) y el complejo PRDM16-CEBP β inducen la expresión de PPAR γ y el coactivador de receptor gamma activado por proliferador de peroxisoma 1 alfa (PGC-1 α) lo que lleva a la diferenciación de los adipocitos marrones.²⁶

PGC-1 α es importante para el tejido adiposo marrón debido a que coopera con PPAR γ y receptores activados por proliferadores de peroxisoma alfa (PPAR α), que regulan el metabolismo oxidativo y la biogénesis mitocondrial. También CEBP β es importante debido a que es clave para la expresión de UCP1 además del proceso de termogénesis en el tejido adiposo marrón.²⁶

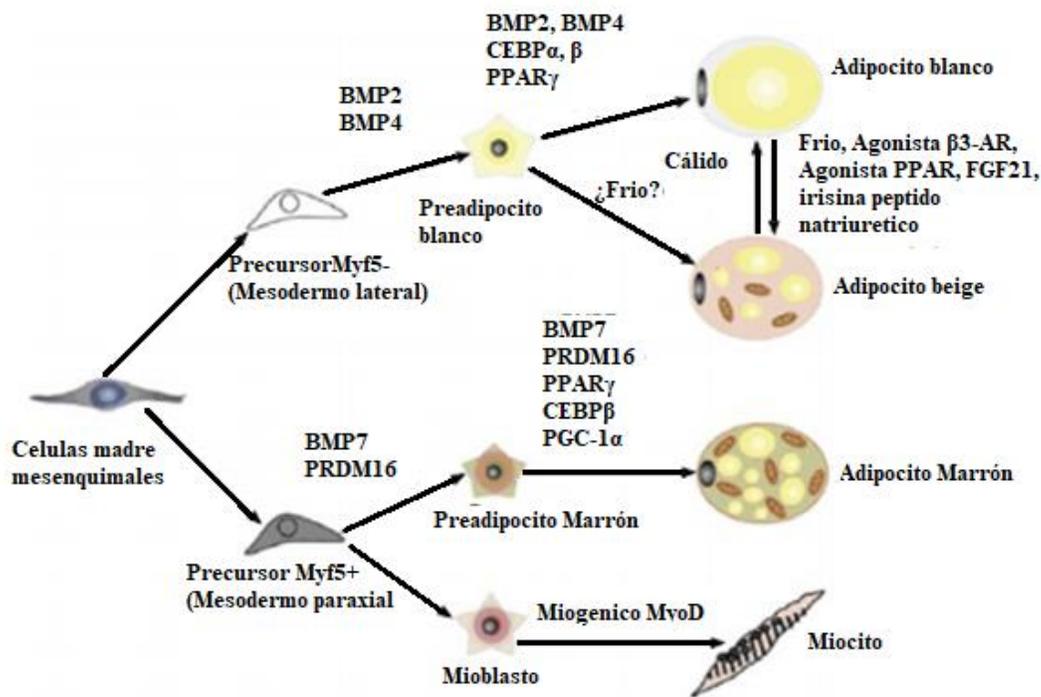


Figura 1. Diferenciación de los adipocitos blancos, marrones y beige. Los adipocitos provienen de un precursor mesenquimal. Los adipocitos blancos necesitan de BMP2 y BMP4 para transformarse en preadipocitos blancos, que requiere a CEBP α , CEBP β y PPAR γ para llegar a ser un adipocito blanco maduro. La formación del tejido adiposo beige puede ser por la exposición de los adipocitos blancos a la exposición crónica al frío o bien exposición a un agonista β -adrenérgico (β 3), un agonista de PPAR, FGF21, irisina o al péptido natriurético. Los precursores Myf5+ se inducen a adipocitos marrón por exposición a BMP7 y PRDM16 y posteriormente a PPAR γ , CEBP β , y PGC-1 α . Modificado de Park, 2014.

2.3.3. Tejido adiposo beige

El tejido adiposo beige, tiene características de los adipocitos marrones y de los blancos. Sus adipocitos tienen una morfología con vesículas lipídicas uniloculares y presentan patrones de expresión génica similares a los adipocitos blancos, pero cuando se estimulan con el frío se expresa la proteína UCP1. Los procesos de pardeamiento son reversibles, es decir que pueden regresar a ser adipocitos blancos con un patrón de expresión reducido de los genes presentes en los adipocitos color marrón.²⁵

Las células adiposas beige están presentes mayoritariamente dentro del tejido adiposo blanco subcutáneo. Los adipocitos beige provienen de adipocitos blancos.²⁹ El factor temprano 2 de células B (EBF2) se expresa en un subconjunto de células precursoras de tejido adiposo blanco. Cuando se expone al frío se aumenta su expresión y promueve la diferenciación a adipocitos beige. Al igual que EBF2, PRDM16, Proteína de dedos de zinc 516 (ZFP516) y PGC1a promueven la adipogénesis beige.³⁰

2.4. Adipogénesis

Los depósitos de tejido adiposo deben remodelarse continuamente para cumplir con su función de homeostasis energética. El proceso de diferenciación de los adipocitos involucra estadios. Los precursores mesenquimales, los preadipocitos comprometidos, preadipocitos quiescentes, preadipocitos en expansión clónica mitótica, adipocito terminal y adipocitos maduros.^{31,7}

Durante el proceso de diferenciación de adipocitos hay varias interacciones moleculares. Los miembros de proteínas de unión al potenciador de CCAAT (C/EBPs) y el receptor activador de la proliferación de peroxisomas (PPAR), son miembros importantes para la regulación de la diferenciación del linaje de los adipocitos, también desempeñan papeles en la función de los adipocitos maduros.^{31,7}

Existen otros factores importantes, que no inducen la adipogénesis por sí mismos, pero si pueden promoverla, entre ellos están, la adipocina 1/ Factor de transcripción de unión

a elementos reguladores de esteroles (ADD1/SREBP1c), este factor activa la lipoproteína lipasa y la sintasa de ácidos grasos.³²

CEBP α y PPAR γ funcionan como activadores transcripcionales de un gran grupo de genes que conducen la determinación y diferenciación del adipocito³³, así mismo estos factores de transcripción están involucrados en la diferenciación terminal.

2.4.1 Hipertrofia

Una dieta rica en ácidos grasos inicialmente conduce a la hipertrofia del adipocito; si el estímulo es continuo o las reservas energéticas han sido cubiertas en el adipocito, se favorece la hiperplasia del tejido adiposo.³⁴ La hipertrofia es un aumento del tamaño de los adipocitos, mientras que la hiperplasia es el aumento en el número de células. La hipertrofia se ha asociado con dislipidemias, resistencia a la insulina y diabetes mellitus tipo 2. El aumento del tamaño de los adipocitos se correlaciona con inflamación y la susceptibilidad a muerte celular.³⁵

Los adipocitos hipertróficos tienen cuatro características: la primera es que presentan anomalías de tipo necrótico. Esto ocasiona que cuando los adipocitos mueren se libera su contenido intracelular induciendo inflamación. La segunda característica es que expresan y secretan una cantidad mayor de citocinas proinflamatorias, incluyendo IL-6, IL-8, TNF α y la proteína quimiotáctica de monocitos-1 (MCP-1, del inglés *Monocyte chemoattractant protein 1*),). Estas citocinas proinflamatorias también promueven la inflamación del tejido adiposo por el reclutamiento de células inmunitarias como las células T y los macrófagos.³⁷ La tercera característica, es que la hipertrofia favorece hipoxia local del tejido adiposo debido a que el incremento en volumen no se compensa con el aumento en los vasos sanguíneos, lo que ocasiona que a los adipocitos que se localizan más internamente no estén irrigados suficientemente. Esto disminuye el aporte de oxígeno y activa el factor inducible por hipoxia (HIF1 α), que participa en el desarrollo de fibrosis del tejido adiposo. La cuarta característica es que, en los adipocitos hipertróficos, la lipólisis basal está elevada, incrementado la salida de ácidos grasos libres, la acumulación de lípidos ectópicos, lo que a su vez favorece el desarrollo de dislipidemias y lipotoxicidad.³⁷

2.4.2 Hiperplasia

Se ha sugerido que la hiperplasia subcutánea desempeña un papel protector contra trastornos metabólicos como dislipidemias, resistencia a la insulina y diabetes mellitus tipo 2. Cuando se realiza un trasplante de tejido adiposo subcutáneo en ratones que carecen de él, se curan de hígado graso, así como de la resistencia a la insulina.³⁸ En humanos, cuando se administra tiazolidinedionas como la Pioglitazona se induce la proliferación del tejido adiposo y se restablece la sensibilidad a la insulina.³⁹

La hiperplasia del tejido adiposo se produce cuando las células precursoras de los adipocitos se diferencian en adipocitos. Esto se debe a la acción de varios factores de transcripción y hormonas como por ejemplo PPAR γ y CEBP α . Aún no se conocen las implicaciones de la hiperplasia en la función del tejido adiposo, pero se cree que puede tener efectos benéficos contra la disfunción del tejido adiposo generada por la hipertrofia de los adipocitos.³⁹

2.5 Factores que propician sobrepeso y obesidad

La obesidad surge cuando hay un desequilibrio entre las calorías consumidas con las calorías gastadas, lo que provoca un excedente energético que resulta en el almacenamiento de ácidos grasos que resulta en acumulación de tejido adiposo.⁴⁰

La obesidad es una enfermedad multifactorial, ya que depende de varios factores que regulan el almacenamiento energético, entre los que se encuentran: el estilo de vida -ya sea el sedentarismo o la ingesta excesiva de alimentos-, factores genéticos, consumo de ciertos medicamentos², problemas sociales y económicos, además de algunos problemas médicos como el síndrome de Prader-Willi.⁴¹

2.6 Genes implicados en la obesidad

Hay estudios a gran escala llamados estudios de asociación del genoma completo (GWAS, del inglés *Genome-Wide Association Study*), en donde se analizan las variaciones genéticas a lo largo de todo el genoma para identificar variantes genéticas asociadas a enfermedades. Se han hecho GWAS en obesidad y se han identificado al menos 58 loci genéticos asociados con ésta en poblaciones europeas. Uno de los primeros en ser

identificado fue el gen FTO en varias poblaciones europeas. En otros estudios, se encontró un gen que codifica para el receptor de melanocortina 4 (MC4R) asociado a obesidad en niños y en adultos en población europea. En otro estudio, se encontraron SNPs cercanos a los genes TMEM18 que codifica para la proteína transmembranal 18; GNPDA2 que codifica para la proteína glucosamina-6-fosfato desaminasa 2, SH2B1 que codifica para la proteína adaptadora 1 de SH2B; MTCH2 que codifica el portador mitocondrial homólogo 2; KCTD15 codifica para el dominio de tetramerización del canal de potasio 15 y NEGR1 que codifica para el regulador de crecimiento neuronal 1. En Islandia se identificaron ETV5 que codifica para el factor de transcripción 5 variante ETS, BDNF que codifica para el factor neurotrófico derivado del cerebro, SEC16B que codifica para la proteína de transporte de proteínas Sec16B, y FAIM2 que codifica para la molécula inhibidora apoptótica 2 de Fas.³

En estudios de genes candidatos, realizado en poblaciones caucásicas, se han descubierto más de 430 genes implicados en la fisiopatología de la obesidad. Entre estos genes candidatos más importantes son genes de la adiponectina (ADIPOQ), gen del factor de transcripción PPAR γ , para la proteína Ectonucleótido pirofosfatasa / fosfodiesterasa 1 (ENPP1), la proproteína convertasa 1 (PCSK1) y el factor de transcripción 7-like 2 (TCF7L2).⁴²

El gen ADIPOQ codifica para la adiponectina, hormona del tejido adiposo que se encarga de regular el gasto energético, del catabolismo de los lípidos y la sensibilidad a la insulina y que se asocia a la reducción de glucosa en sangre.⁴³ Esta hormona se localiza en el brazo largo del cromosoma 3 en la banda 27. Además, se han encontrado múltiples polimorfismos que influyen en su actividad; algunos de ellos son el rs2241766 y el rs1501299, que se asocian con resistencia a la insulina y concentraciones bajas de adiponectina.⁴⁴

PPAR γ es un gen que codifica para los receptores activadores de la proliferación de peroxisomas, se localiza en el brazo largo del cromosoma 3, en la banda 25.⁴⁵ Su función es promover la adipogénesis. El SNP Pro12Ala se ha asociado a un IMC mayor en adultos ingleses.⁴⁶

El gen ENPP1 se encuentra en el brazo largo del cromosoma 6, en la banda 22-23. Codifica para la enzima fosfodiesterasa/pirofosfatasa de ectonucleótido 1, proteína cuya función se relaciona con la vía de señalización de la insulina que lleva a la inactivación del

receptor, por lo cual provoca resistencia a la insulina. El SNP K121Q se ha asociado con obesidad en caucásicos.⁴⁷

2.7 Polimorfismos de un solo nucleótido

El polimorfismo de un solo nucleótido (SNP, por sus siglas en inglés) es una variación alélica que corresponde al cambio de una sola base nucleotídica en una secuencia de ADN. Sin embargo, para que sea considerado un SNP debe presentarse en al menos el 1% de la población. Cuando no se llega a este porcentaje se dice que es una mutación puntual.⁴⁸ Los SNPs son el tipo más común de variación alélica en el genoma. Hay dos tipos de SNPs, neutros y funcionales. Los neutros como su nombre lo indica no tienen efecto, mientras que los funcionales afectan procesos biológicos.⁴⁸

En la actualidad se han descrito más de 10 millones de SNPs, pero se estima que existen muchos más, las estimaciones predicen existe un SNP al menos uno cada 100-300 nucleótidos.⁴⁸

Existen diferentes clasificaciones de los SNPs funcionales. La principal se basa en su localización. Así, por ejemplo, a los SNPs que se encuentran en la región intrónica se les denomina iSNP, a los que están en las regiones reguladoras se les nombra rSNP⁴⁹, y a los que están en los exones se le llama cSNPs. Estos últimos a su vez se subdividen en sinónimos y no sinónimos. Los cSNPs sinónimos son aquellos en los que el cambio del nucleótido no altera la secuencia de aminoácidos de la cadena polipeptídica, es decir en el proceso de la traducción, el codón correspondiente codifica para el mismo aminoácido, mientras que, en el caso de los no sinónimos si se afecta la secuencia de la cadena polipeptídica debido a que se traduce un aminoácido diferente.⁴⁸

Los SNPs son de gran importancia debido a que pueden ser responsables de alterar la concentración de las proteínas o de modificar sus afinidades, es decir que cambien su estructura química y no pueda interactuar con complejos moleculares, esto puede predisponer al desarrollo de alguna enfermedad o establecer la susceptibilidad a padecerla. Debido a que estas variantes pueden estar localizadas en la región promotora del gen, en los intrones, en los sitios de *splicing* o en regiones intragénicas, es factible que otros mecanismos no relacionados con cambios estructurales en la proteína también participen.

2.7.1. SNPs relacionados con la obesidad en población mexicana

El estudio de los SNPs es importante debido a que pueden ser utilizados como marcadores biológicos para el diagnóstico y predicción del comportamiento de enfermedades.⁴⁹ Se han encontrados varios SNPs asociados a la predisposición al sobrepeso y a la obesidad, un ejemplo de ellos son el SNP rs9939609, rs1421085 y rs8057044 del gen asociado a la obesidad (FTO), este gen codifica para una oxidasa dependiente de hierro y 2-oxoglutarato.⁵⁰ Estos SNPs son intrónicos, aunque aún no está clara la importancia funcional, se cree que estos SNPs están presentes en secuencias reguladoras del procesamiento del ARNm que repercuten en los niveles de la proteína.⁵⁰ Estos SNPs se han estudiado en niños mexicanos, El SNP rs9939609 se asoció con niveles más altos de IMC y aumento de la presión arterial arterial (OR 3.9; 95 % IC 1.46) en niños de Querétaro.⁵¹ En otro estudio realizado en niños de edad escolar en la comunidad maya, se encontró que el SNP rs1421085 se asocia con obesidad, los SNPs rs1421085 y rs9939609 se asociaron con susceptibilidad a obesidad en niñas (OR: 2.56, 95% IC: 1.36-4.79), (OR: 1.58, 95% IC: 1.02-2.46) respectivamente, mientras que el SNP rs8057044 se asoció con sobrepeso en varones (OR: 2,92, 95% IC: 1,04-8,20)⁵².

Otro SNP relacionado con la obesidad es el SNP R230C del gen Miembro 1 de la subfamilia de transportadores ABCA (ABCA1) que es un transportador de eflujo que participa en la salida del colesterol y la formación de HDL. Este SNP se asoció con obesidad, pero también con hipoalfalipoproteinemia, diabetes mellitus tipo 2 y síndrome metabólico en mestizos mexicanos.⁵³ Este SNP solo se ha encontrado en poblaciones nativas americanas y mexicanas mestizas.⁵⁴

2.8 Familia CEBP

Esta familia pertenece a los factores de transcripción de cremalleras de leucinas; posee un Dominio básico de cremallera de leucinas (bZIP), donde puede hacer homodímeros o heterodímeros con los demás miembros de la familia; todas las isoformas de CEBP comparten una identidad de secuencia en los residuos de aminoácidos 55-65 del C-TERMINAL. Esta familia, además, tiene una región de unión al ácido desoxirribonucleico (ADN) que es rica en aminoácidos básicos. En la Figura 2 se muestra la estructura del homodímero de bZIP del CEBP β unido al ADN.⁵⁵

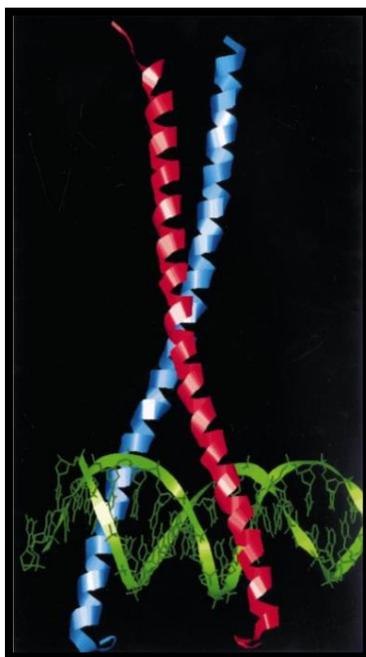


Figura 2. Estructura de CEBPB. Se muestra en azul y rojo los dímeros de CEBP β unidos a una cadena de ADN por medio de su sitio de unión al ADN. Figura tomada de ⁵⁵

El bZIP es una repetición heptada de 4 a 5 residuos de leucina. Para que la proteína se pueda unir al ADN se debe dimerizar por medio de la región básica que esta dictada por la secuencia de aminoácidos dentro de esta misma región El dímero forma una estructura de Y invertida en donde se une a una secuencia de reconocimiento palindrómico en el surco mayor del ADN como si fueran unas tijeras. ⁵⁵

Las proteínas CEBP pueden formar heterodímeros con los diferentes miembros de su familia, debido a su alta conservación en el dominio bZIP. Existen seis miembros de la familia de las proteínas CCAAT de unión al potenciador. (CEBP) que se han identificado hasta la fecha CEBP α , CEBP β , Proteina CCAAT de union al potenciador gamma (CEBP γ) Proteina CCAAT de union al potenciador delta (CEBP δ) Proteina CCAAT de union al potenciador epsilon (CEBP ϵ) y Proteina CCAAT de union al potenciador zeta (CEBP ζ) CEBP α , CEBP β , CEBP γ , CEBP δ no tienen intrones mientras que CEBP ϵ y CEBP ζ contienen dos y cuatro, respectivamente. Se ha determinado que hay un sitio de unión óptimo para la familia CEBP, RTTGCGYAAY en donde R es A o G e Y es C o T. ⁵⁵. El único miembro de la familia que no puede formar heterodímeros es CEBP ζ debido a que tiene dos residuos de prolina en la región básica que rompen con la estructura helicoidal y

cuando se heterodimeriza no puede unirse a la secuencia de reconocimiento de CEBP en el promotor de genes diana, por lo tanto, puede actuar como un inhibidor de la función de CEBP.⁵⁵

En contraste con la región bZIP que es altamente conservada, la familia CEBP en sus extremos N son bastantes divergentes, solo tienen un 20% de identidad de secuencia con excepción de los dominios de transactivación, que interactúan como componentes del aparato de transcripción basal y estimulan la transcripción. El único miembro que no tiene los sitios de transactivación es CEBP ζ , por lo tanto, actúa como un represor de la transcripción del gen y forman heterodímeros inactivos con los demás miembros de la familia. En la Figura 3 se muestra a los miembros de la familia con los sitios importantes de cada uno. Además, varios miembros de la familia CEBP en el extremo N tienen regiones reguladoras negativas que aún no se dilucida totalmente cómo funcionan.⁵⁵

CEBP, CEBP α y CEBP β pueden producir péptidos de distinto tamaño mediante el uso alternativo de codones de iniciación de la traducción. En la Figura 3 se pueden observar los diferentes péptidos que se pueden formar. Como ya se mencionó anteriormente, los miembros de la familia pueden formar heterodímeros, facilitando así varias opciones para ensamblar diferentes complejos multiproteicos potenciales de transactivación, por lo que es probable que en dicha heterodimerización se tenga un efecto en la regulación de genes diana distintos; además de esto, la familia de los CEBP puede formar interacciones proteína-proteína con los factores de transcripción bZIP y no bZIP.⁵⁵

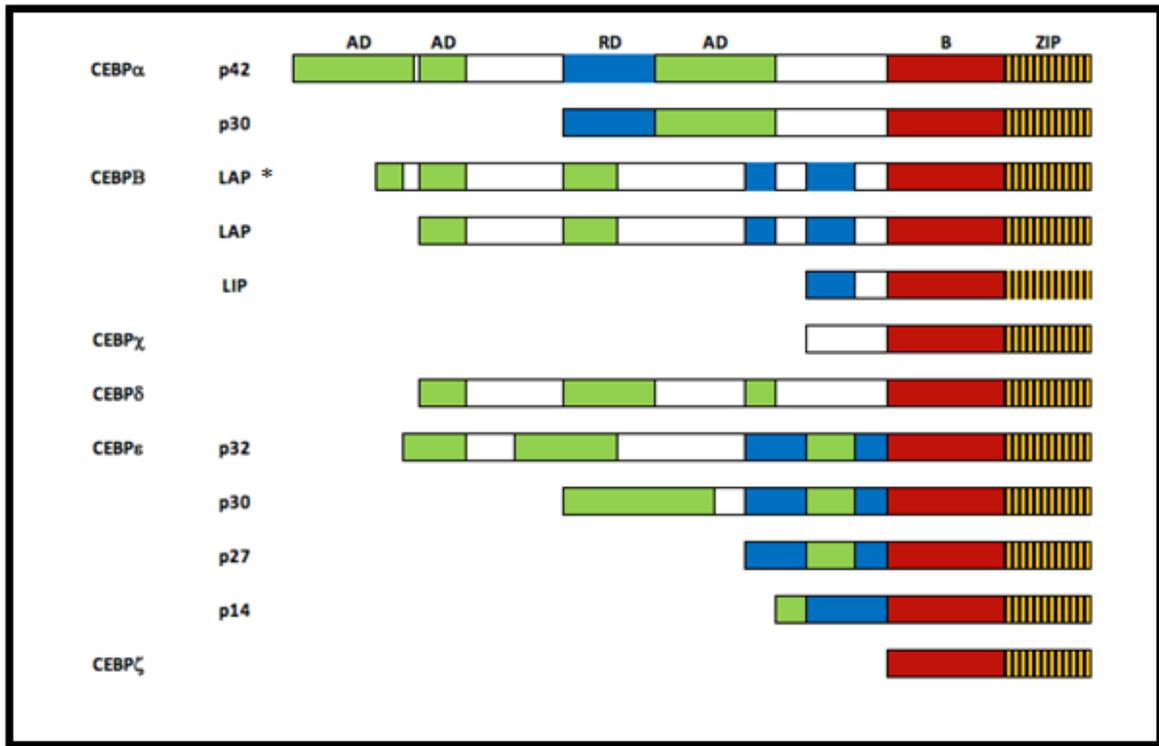


Figura 3. Representación del gen de la familia de los CEBPs. En verde son los sitios de transactivación. En azul son los dominios reguladores negativos. En amarillo rayado son los residuos de leucinas y en la parte roja son las regiones básicas de la proteína. AD=Dominios de activación, RD=Dominios reguladores, B=Región básica, ZIP=Dominio de cremalleras de leucinas, p42=Proteína de 42 kDa, p30=Proteína de 30 kDa, LAP=Proteína de 38kDa, LAP= Proteína de 35kDa, LIP=Proteína de 20kDa, p32= Proteína de 32 kDa, p30= Proteína de 30 kDa, p27= Proteína de 27 kDa, p14= Proteína de 14 kDa. Modificado de Ramji 2012.

El patrón de expresión de la familia de CEBP es muy diverso, como se muestra en la Tabla 2. CEBPα se expresa preferentemente en el tejido adiposo (incluido el subcutáneo⁵⁶), en el hígado, en el intestino, pulmón, glándula suprarrenal, en células mononucleares de sangre periférica y placenta.⁵⁶ Sin embargo, se encuentra más altamente expresado en hígado y tejido adiposo.⁵⁷

CEBPβ se expresa en hígado, intestino, pulmón, tejido adiposo, bazo, riñón, y células mielomonocíticas; CEBPδ se expresa más en tejido adiposo, pulmón e intestino; CEBPγ y CEBPζ se expresan en todo el organismo; CEBPε se expresa en células mieloides y linfoides.⁵⁵

Tabla 2. Perfil de expresión de las proteínas de la familia CEBPs.

Miembro de la Familia	Distribución tisular
CEBPα	-Tejido adiposo -Hígado -Intestino -Pulmón -Glándula suprarrenal -Placenta -Células mononucleadas de sangre periférica
CEBPβ	-Hígado -Intestino -Pulmón -Tejido adiposo -Bazo -Riñón -Células mielomonocíticas
CEBPγ	-Ubicua
CEBPδ	-Tejido adiposo -Pulmón -Intestino
CEBPϵ	-Células mieloides -Células linfoides
CEBPζ	-Ubicua

Modificado de Ramji 2012

La familia CEBP tiene roles importantes en varios procesos, incluida la diferenciación, la respuesta inflamatoria, la regeneración hepática y el metabolismo, entre otras. En la diferenciación de los adipocitos, la familia de CEBPs, junto con otros factores como son PPAR γ y SREBP1 actúan como reguladores de la adipogénesis. Para que ocurra la diferenciación de preadipocitos que han sido detenidos por el crecimiento se debe adicionar hormonas adipogénicas, que incluyen un agente que elevan el adenosín monofosfato cíclico (AMPc), un glucocorticoide y factores de crecimiento semejantes a la insulina (IGFs) lo que ocasiona que los preadipocitos entren en expansión clonal mitótica. En esta fase el CEBP β y CEBP δ que han sido inducidos por el AMPc y por glucocorticoides, provoca la expresión de CEBP α , esta produce marcadores específicos de adipocitos maduros, ⁵⁵

La presencia de CEBP β y CEBP δ es importante, ya que en ausencia de hormonas adipogénicas son capaces de iniciar el programa de diferenciación. En este sentido, estudios *in vitro* han demostrado que cuando se expresa el ARN antisentido de CEBP α en células 3T3-L1 se bloquea la diferenciación, y en fibroblastos embrionarios que carecen de CEBP β y CEBP δ no se puede iniciar la diferenciación en respuesta a una estimulación hormonal. *In vivo*, se observó en ratones deficientes de CEBP α mueren después del nacimiento debido a hipoglucemia, y no son capaces de acumular lípidos en tejido adiposo.⁵⁵

En las células mieloides los CEBP están presentes en regiones promotoras de genes que expresan dichas células. CEBP α se expresa altamente en los progenitores mieloides tempranos; CEBP ϵ se expresa en la maduración de las células progenitoras de los granulocitos; CEBP β está regulado por incremento durante la diferenciación de macrófagos. Se han realizado estudios en donde se utilizan ratones deficientes de CEBP α que no son capaces de lograr una diferenciación mieloides más allá de la etapa de mieloblastos y carecen de neutrófilos maduros.⁵⁵

Además de adipocitos y de células mieloides, los miembros de la familia CEBP tienen injerencia en varios tipos celulares como hepatocitos, células epiteliales mamarias, células lúteas ováricas, queratinocitos, células neuronales y células epiteliales intestinales. Otra de sus funciones es en el metabolismo, cuando se altera CEBP α específicamente en el hígado se provoca un trastorno metabólico importante, debido a la reducción de la transcripción de varios genes, sobre todo en los involucrados en la síntesis del glucógeno y la gluconeogénesis.⁵⁵

2.9 Organización, patrón de expresión y función de CEBP α

El gen CEBP α está ubicado en el brazo largo del cromosoma 19, en la banda 13.1.⁵⁸ Pertenece a la familia de las proteínas de unión CCAAT,⁵⁹ es un gen que no posee intrones y codifica para un factor de transcripción que contiene un dominio de unión de cremallera de leucina (bZIP) además de reconocer el elemento de respuesta CCAAT de los promotores de sus genes diana.⁵⁹

La representación estructural de la organización de la proteína CEBP α se muestra en la Figura 4. La proteína posee dos sitios de transactivación, el ARN mensajero se puede traducir en dos isoformas, se puede iniciar del primer AUG que codifica para la isoforma de

42kDa y la segunda isoforma del segundo AUG de 30 kDa, en donde se pierde el primer sitio de transactivación. Las funciones de la isoforma de 30kDa no son conocidas, pero hay evidencias de que ésta ha perdido las funciones normales de CEBP α y tiene un efecto dominante negativo sobre CEBP α de 42 kDa.⁵⁹

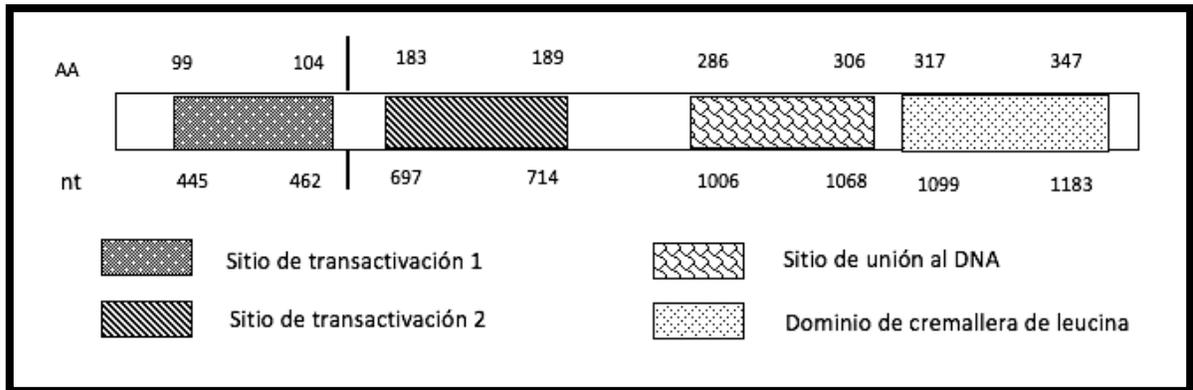


Figura 4. Representación esquemática de los dominios de la proteína CEBP α . Posee dos sitios de transactivación por lo cual puede formar dos proteínas de diferente tamaño (30 y 42 kDa), también posee un sitio de unión al ADN y un dominio de cremallera de leucina por el cual forma dímeros o heterodímeros. Modificado de Leroy.⁵⁹

El dominio de cremallera de leucina consiste en una repetición de 4 a 5 residuos de leucina y forma una α -hélice. Para que se pueda unir al ADN se debe dimerizar la proteína, mediada por la región básica. El dímero, forma una Y invertida en la que cada brazo está formado por una región básica, en unión a la mitad de una secuencia palindrómica en el surco mayor del ADN.⁵⁵

2.9.1 Participación de CEBP α en la adipogénesis

Varios estudios han demostrado que CEBP α es un factor clave en la adipogénesis, ya que participa en la diferenciación de los preadipocitos en adipocitos. Este factor de transcripción también está involucrado en el metabolismo de los lípidos y de la glucosa.⁶⁰ Así mismo, se ha visto que los ratones deficientes de CEBP α almacenan muy pocos lípidos dentro del tejido adiposo.⁵⁵ En la adipogénesis CEBP α tiene una expresión tardía en el proceso de diferenciación debido a que su actividad de unión al ADN no se requiere hasta que los preadipocitos atraviesan el punto de control para iniciar la fase S, lo que induce la

expansión mitótica.⁵⁵ También cubre un papel muy importante en el metabolismo de los carbohidratos, ya que los ratones en donde se suprime su expresión mueren después del nacimiento, debido a hipoglucemia severa. Cuando se ha suprimido CEBP α condicionalmente en el hígado, ocasiona trastornos metabólicos debido a que se reduce la transcripción de varios genes, sobre todo aquellos que intervienen en la síntesis del glucógeno, gluconeogénesis y en la desintoxicación de la bilirrubina.⁵⁵

PPAR γ establece un asa de regulación transcripcional con CEBP α en la adipogénesis. En estudios de pérdida de función se ha visto que cuando se inhibe PPAR γ los niveles de CEBP α están reducidos; de igual manera, cuando se carece de PPAR γ se tiene un potencial adipogénico reducido y hay niveles reducidos de CEBP α .⁶¹

2.9.2 Participación de CEBP α en el adipocito maduro

2.9.2.1. Leptina

La leptina (del griego leptos, que significa delgado) es una hormona que se secreta por los adipocitos por acción de diversos estímulos, El gen se encuentra en la banda 32.1 del brazo largo del ²⁰ Es un polipéptido de 167 aminoácidos y pesa 16 kDa,^{62, 63} Entre los principales factores que favorecen la secreción y expresión de la leptina, están el crecimiento de la grasa subcutánea y el estado de almacenamiento de los triacilglicéridos, debido a que la hormona se expresa en el tejido adiposo. Los tejidos donde existe mayor expresión de leptina son en el tejido adiposo subcutáneo, retroperitoneal, omental y en tejidos adyacentes a vías linfáticas. Otro factor importante para la secreción de leptina es la concentración de insulina, quien induce su expresión. En este contexto se ha observado que la administración de insulina aumenta la concentración de leptina en la circulación aumenta.⁶⁴ Mientras que los ácidos grasos libres circulantes funcionan como supresores de su secreción.⁶⁵ La leptina es más abundante durante la noche que durante el día⁶⁶ y sus concentraciones son mayores en el sexo femenino que en el masculino, debido a que las mujeres presentan una mayor cantidad de grasa subcutánea, y el tejido adiposo subcutáneo es el principal productor de leptina.⁶⁷

En estudios sobre el papel de PPAR γ en la expresión de la leptina se demostró que el promotor de leptina está regulado por PPAR γ , pero ésta no se une directamente a

ninguna secuencia de ADN específica dentro de la región, sino que antagoniza la asociación de CEBP α .⁶⁸

CEBP α es un factor transcripcional que activa la transcripción del gen que codifica para la leptina a través de la secuencia de ADN '-T [TG] NNGNAA [TG] -3'.⁶⁹ La mutación del sitio de CEBP α dentro del promotor de leptina da como resultado una pérdida de transactivación por CEBP α . Estos datos establecen que CEBP α es imprescindible para la expresión de leptina.⁵

2.9.2.2 Adiponectina

La adiponectina es una hormona derivada tanto del tejido adiposo blanco como del marrón y su función es clave en el mantenimiento de la homeostasis energética.⁷⁰ La adiponectina sensibiliza a los tejidos para el efecto de la insulina⁷¹ y sus concentraciones son bajas en personas con obesidad. Se asocia más con la grasa visceral que con la subcutánea, y su concentración es baja en patologías como diabetes mellitus tipo 2, hipertensión y síndrome metabólico, condiciones asociadas con resistencia a la insulina.⁷¹ Los niveles de adiponectina circulantes son mayores en mujeres que en hombres⁷², lo que sugiere que las hormonas sexuales pueden regular a la adiponectina, ocasionando que las mujeres sean más sensibles a la insulina que los hombres.⁷⁰ También se ha demostrado que la testosterona disminuye la concentración plasmática de adiponectina lo que puede relacionarse con el riesgo de resistencia a la insulina en hombres.⁷³

Se ha demostrado que el factor de transcripción CEBP α junto con otro factor de transcripción FOXO1 (del inglés *Forkhead box protein O1*) forman un complejo que regula el incremento de la transcripción del gen de adiponectina. SIRT1 (del inglés *Sirtuin 1*) mejora la interacción entre CEBP α y FOXO1 para aumentar la transcripción de adiponectina.⁴

2.9.2.3 Gen asociado con la obesidad (FTO)

FTO se expresa en hipotálamo y los islotes pancreáticos, pero también se expresa en niveles bajos en adipocitos, hígado y tejido músculo esquelético.⁶

En un estudio realizado Ren y colaboradores en 2014, comprobaron que CEBP α es un factor de transcripción que regula positivamente la expresión de FTO y se asocia con elementos de respuesta dentro del promotor del gen FTO.⁶

2.9.3 Interacción con otros factores de transcripción en adipogénesis

Boughanem y colaboradores realizaron un estudio para determinar la resistencia a la insulina está relacionada con obesidad y midieron la expresión del gen de PPAR- γ 2, CEBP α y FOXO1 para poder determinar si existía tal asociación en población de Málaga, España. Se obtuvo que la expresión de CEBP α disminuyó en sujetos con obesidad mórbida, y que en voluntarios con alta resistencia a la insulina disminuyó significativamente la expresión de este gen en comparación con voluntarios con niveles bajos de resistencia a la insulina; PPAR γ -2 tuvo un comportamiento similar. Contrario a esto, se vio un incremento de la expresión de FOXO1 en voluntarios con alto nivel de resistencia a la insulina, lo que sugiere que hay relación entre FOXO1 y resistencia a la insulina durante la diferenciación de adipocitos.⁷⁴

FOXO1 reprime la transactivación de PPAR γ en una vía dependiente de insulina, es un antagonista de PPAR γ . Por lo tanto, se sugiere que hay una relación interdependiente de CEBP α , FOXO1 y PPAR γ 2 que modula la adipogénesis, además se encuentra vinculada a la resistencia a la insulina. En una vía alternativa y una ruta común se conoce que estos interactúan físicamente, cooperan y se activan unos a los otros. El identificar variantes específicas y comprender cómo influye en los mecanismos de regulación transcripcional en el tejido adiposo puede ayudar a conocer la etiología de la resistencia a la insulina que está relacionada con la obesidad y puede llevar a crear nuevas estrategias terapéuticas⁷⁴

2.10 Antecedentes

2.10.1 SNP en CEBP α

En la Tabla 3 se enlistan las variantes genéticas reportadas para síndrome metabólico. El SNP Rs34529039 que es un SNP sinónimo, que no se muestra en esa tabla, es un SNP que se ha encontrado en 15.4% de pacientes con cáncer de ovario.⁷⁵

El SNP rs12691, está ubicado en la región 3'UTR en la posición 33791127 y se localiza a 2304 bases desde el inicio de la secuencia codificante, lo que sugiere que esta variante podría afectar la regulación postranscripcional del ARNm de CEBP α . La región en donde se encuentra es un clúster con hipersensibilidad a ADNasa y con la marca de la histona H3K4me1 está asociada con potenciadores y con las regiones río abajo del inicio de la transcripción. CEBP α podría tener un evento autorregulador ya que se une en la región en donde se encuentra el SNP rs12691.⁶⁰

Olofsson y colaboradores en el año 2008 realizaron un estudio de asociación del SNP rs12691 con dislipidemias, en 4866 individuos suecos con obesidad. Los resultados determinaron que el genotipo AA del SNP rs12691 se asoció con niveles mayores de triacilglicéridos en suero.⁷⁶

Delgado y colaboradores en el 2013, realizaron un estudio de asociación del mismo SNP RS12691 con el metabolismo de la glucosa, incluida la secreción de insulina o sensibilidad a la insulina en pacientes con síndrome metabólico; el estudio se realizó en población europea incluyendo pobladores de Irlanda, Reino Unido, Noruega, Francia, Países bajos, España, Polonia y Suecia. Se observó que esta variante genética influye en el metabolismo de la glucosa en los pacientes con síndrome metabólico.⁶⁰ En 2010 Bennett y colaboradores realizaron un estudio familiar de LEEDS en donde reclutaron a personas blancas del norte de Europa, en búsqueda de SNPs de tres integrantes de la familia de CEBP, CEBP α , CEBP β Y CEBP δ y evaluaron su asociación con los fenotipos relacionados con obesidad. Se encontraron 11 SNPs de CEBP α , pero ninguno se encontró en el dominio de unión al ADN; de ellos, 919G> A se asoció con la relación cintura/cadera, mientras que el SNP 1558G> A se asoció con disminución de leptina plasmática.⁷⁷

CEBP α forma homodímeros o heterodímeros con otros miembros de la familia CEBP o con otros factores de transcripción. CEBP α puede formar dos diferentes transcritos

lo que provoca dos isoformas, una de 42 kDa y otra de 30 kDa. Se pueden tener SNPs que afectan la traducción de la variante de 42kDa y favorecen la síntesis de la de 30 kDa, también pueden presentarse en la región de la cremallera de leucina o en el dominio de unión al ADN, y provocar que no exista dimerización con otras proteínas o que no haya interacción con el ADN.⁷⁸

Tabla 3. SNPs de CEBPa en componentes del síndrome metabólico

Población de estudio	SNP y Cambio de nucleótido	Región del gen y del transcrito primario	Cambio de aminoácido	Protector/ riesgo	Función	Frecuencia	Resultado
Finlandia,⁷⁶ Suecia^{60,76} Irlanda, Reino Unido, Noruega, Francia, Países Bajos, España, Polonia y Suecia.⁶⁰	Rs12691 1587G>A transición púrica> púrica	Unidad Transcripcio nal Exónica, Regulatoria, 3'UTR.	No hay un cambio de aminoácidos, es una variante 3' UTR ⁷⁹	Se observó que existe un riesgo al aumentar los niveles de triglicéridos en presencia del SNP	Tiene una función reguladora debido a que se encuentra en la región 3'UTR.	Se detectó el 21.64%, (113/522) en estudio "The Swedish Obese Subjects", siendo heterocigotos el 19.92% (104/522) y homocigotos el 1.72% (9/522). ⁷⁶ En cuanto al estudio de Bosnia está presente en el 21.51% (1004/4667), siendo heterocigotos el 19.58% (914/4667) y homocigotos el 1.92% (90/4667). ⁷⁶ El estudio de LIPGENE se	El Genotipo AA de rs12691 se asoció con niveles más altos de triglicéridos en suero, con un promedio de 252.21± 2.72 g/dL a comparación del genotipo G/G que obtuvo de promedio 134.51±0.93 g/dL de triglicéridos ⁷⁶ La sensibilidad a la insulina fue menor en genotipo A/A (n=8) promedio de 2.5± 0.1 a comparación de 3±0.1 del genotipo G/G (n=300). ⁶⁰

						<p>obtuvo una frecuencia del 23.85% (94/394) siendo el 13% (86/394) heterocigotos, y el 1.7% (8/394) homocigotos.⁶⁰</p> <p>Se detectó el 16.24% según TOPMED (20393/125568)⁸⁰</p>	
Europeos del norte ⁷⁷	rs41490344 -919G>A ⁷⁷ transición púrica> púrica	<p>Región Reguladora río arriba del inicio de la transcripción</p> <p>No se encuentra en la Unidad transcripcional. Se encuentra en la región 5' río arriba</p>	No hay cambio en aminoácido ⁸¹	Se asoció con disminución de la relación cintura cadera y con valores mayores de HDL ⁷⁷	Su función es reguladora.	<p>Se detectó en el estudio de LEEDS el 1.69% (9/532).⁷⁷</p> <p>Se detectó el 0.81% según TOPMED1022 /125568)⁸²</p>	<p>Se asoció con una disminución de la relación cintura-cadera, el genotipo G/A(n=9) tuvo una media de 0.79± 0.07 a comparación de 0.86 ± 0.10 del genotipo G/G (n=523) También se asoció con valores mayores de HDL, el genotipo G/A(n=9) tuvo una media de 69.5±22.01 mg/dL a</p>

							comparación de 56.37±16.6 mg/d del genotipo G/G (n=523) ⁷⁷
Europeos del norte ⁷⁷	rs41367646 1558 G>A ⁷⁷ transición púrica> púrica	Unidad Transcripcio nal Exónico, Regulador en el 3'UTR	No hay cambio de aminoácidos, es una variante 3 UTR ⁸³	Se asoció con niveles disminuidos de leptina plasmática	Tiene una función reguladora debido a que se encuentra en la región 3'UTR.	Se detectó en el estudio de LEEDS el 5.37% (28/521). ⁷⁷ Se detectó el 1.34% según TOPMED1650 /125568) ⁸⁴	Se asoció con la disminución de leptina plasmática, el genotipo G/A tuvo una media de leptina plasmática de 13.50±16.94 ng ml-1, mientras que el genotipo G/G tuvo una media de leptina plasmática de 14.17±18.13 ng /ml ⁷⁷
Europeos del norte ⁷⁷	rs41428545 -586G>A transición púrica> púrica	Región Reguladora, río arriba del inicio de la transcripció n Regulador se encuentra río arriba de la unidad transcripcio nal.	No hay cambio en aminoácido	Se asoció con índices de glucosa y HOMA mayores ⁷⁷	Su función es reguladora.	Se detectó en el estudio de LEEDS el 2.45% (13/529). ⁷⁷ Se detectó el 1.85% según TOPMED1650 /125568) ⁸⁵	Aumento de glucosa y HOMA. El genotipo G/A 6.35 ± 3.73 mM de glucosa a comparación de 5.13± 0.81 mM del genotipo GG, en cuanto al HOMA el genotipo G/A fue de 6.31± 13.73, mientras que el genotipo GG fue de 2.02± 2.87 ⁷⁷

2.10.2 Estudios previos del laboratorio de biología de células trocales.

En el laboratorio 11 de la Facultad de Medicina de la UAEM se han llevado a cabo 3 estudios de búsqueda de SNPs en el gen PPAR γ , el primer estudio fue realizado por Salgado-Balderas en el 2016, en donde el objetivo fue identificar nuevos SNPs en el sitio de transactivación del factor de transcripción PPAR γ y establecer su asociación con dislipidemias en sujetos con obesidad. En la Tabla 4 se puede observar los SNPs encontrados y sus frecuencias. Se encontraron 45 SNP, de las cuales 40 fueron nuevos SNPs y 5 ya habían sido publicados previamente (recuadro naranja). Se observó que las frecuencias van del 3.3 al 90%.⁸⁶

Tabla 4. SNPs encontrados en el sitio de transactivación de PPAR γ por Salgado en 2016.

Total (Var)	Total (WT)	Posición	Cambio
30.0	70.0	96863	A>G
26.7	73.3	96864	T>G
40.0	60.0	96875	G>A
36.7	63.3	96877	G>T
40.0	60.0	96883	A>T
33.3	66.7	96887	T>G
16.7	83.3	96893	A>G
16.7	83.3	96898	C>T
36.7	63.3	96901	T>G
43.3	56.7	96915	T>G
13.3	86.7	96926	G>A
33.3	66.7	96927	T>A
13.3	86.7	96929	A>G
23.3	76.7	96930	T>G
40.0	60.0	96932	G>A
70.0	16.7	96935	G>A
13.3			G>C
40.0	60.0	96939	A>C
3.3	96.7	96941	T>C
6.7			A>C
6.7	86.7	96945	A>T
23.3	76.7	96949	C>T
10.0	90.0	96960	A>C
33.3	66.7	96961	G>C
26.7	73.3	96968	A>T
10.0	90.0	96979	C>T
3.3	96.7	96983	T>C
33.3	66.7	96988	C>T
36.7	63.3	96989	A>T
40.0	60.0	97007	G>A
90.0	10.0	97010	G>A
56.7	43.3	97013	A>T
73.3	26.7	97018	A>T
3.3	96.7	97023	C>A
73.3	26.7	97026	G>A
3.3	50.0	97036	G>A
46.7			G>T
10.0	90.0	97040	G>T
73.3	16.7	97046	G>A
10.0			G>T
6.7	93.3	97053	A>T
16.7	76.7	97054	G>T
6.7			DELG
10.0	60.0	97055	T>A
30.0			DELT

WT: Tipo silvestre; Var: variante; Recuadro anaranjado porcentaje de variantes previamente reportadas.

Tomada de Salgado-Balderas 2016.⁸⁶

Con estos resultados, Santander-Ocampo en el año 2019 realizó la determinación de la frecuencia de 4 de los SNPs reportados (96877 G>T, 96887 T>G, 96915 T>G, 97055 T>A), en voluntarios de 18 a 20 años con y sin sobrepeso y obesidad. Como se puede observar en la Tabla 5, no se encontró ninguno de los 4 SNPs reportados anteriormente por Salgado-Balderas, pero se lograron encontrar 4 variantes nuevas con frecuencias que iban del 1.87 al 3.7%.⁸⁷

Tabla 5. SNPs encontrados en el gen PPAR γ de voluntarios sanos de 18 a 20 años

Posición	Cambio	Total (Var)%	Total (WT) %
96803	T>C	1.85	98.15
96807	T>G	1.85	98.15
96840	A>T	1.85	98.15
97012	A>T	3.7	96.3
96877	G>T	0	100
96887	T>G	0	100
96915	T>G	0	100
97055	T>A	0	100

Tabla tomada de Santander-2019⁸⁷

El último estudio fue el realizado por Salgado-Cortez en el 2020, en donde el objetivo fue identificar nuevos SNPs en el dominio de unión al ADN de PPAR γ en voluntarios con dislipidemias de 18 a 25 años de la Facultad de Medicina de la UAEM. En la Tabla 6, se identificaron 13 SNPs en el exón 5 de PPAR γ , con frecuencias que van del 3.3 a 13.3%.⁸⁸

Tabla 6. SNPs encontrados en el exón 3 de PPAR γ por Salgado 2020

Posición	Cambio	Total (Var)%	Total (WT)%
109781	C>A	3.3	96.7
109793	A>C	3.3	96.7
109798	A>C	3.3	96.7
109826	G>C	3.3	96.7
109844	G>A	13.3	86.7
109844	G>C	3.3	96.7
109852	T>C	3.3	96.7
109854	T>C	3.3	96.7
109864	C/T	3.3	96.7
109872	G>C	3.3	96.7
109873	A>C	3.3	96.7
109881	T>C	3.3	96.7
109888	G>C	6.7	93.3

Tomada de Salgado 2020

3. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

La obesidad es un problema de salud pública que debe ser atendido ya que la calidad de vida y de salud del individuo se ve deteriorada, debido a que contribuye al desarrollo de enfermedades como dislipidemias, diabetes, hipertensión arterial, afecciones cardiovasculares y cáncer. Según la OMS, en 2016 existían más de 1900 millones de personas con estas patologías. En México tanto en la población pediátrica como en la adulta hay un incremento importante; según la ENSANUT 2018-19, la prevalencia de sobrepeso y obesidad pasó de 69.4% en 2012 a 73% en 2018.¹³

Es una condición multifactorial en la que intervienen factores ambientales, psicológicos, sociales y genéticos. Hay evidencias en las que se ha demostrado que diversos genes ocasionan mayores índices de masa corporal, como el gen FTO, el gen de la leptina y el gen de la adiponectina.

Se ha observado que la población mexicana tiene diferente fondo genético, comparado con las poblaciones caucásicas y asiáticas. Un ejemplo de ello es el gen ABCA1 en que el SNP R230C solo se ha encontrado en población amerindias, por lo que la búsqueda de nuevos polimorfismos contribuye a su caracterización y posibilita la evaluación en esta población de asociaciones con patologías que representan un problema de salud pública, como el sobrepeso y la obesidad. En relación con los genes que han mostrado asociación con su ocurrencia y con la de síndrome metabólico en otras poblaciones, ninguno de estos se ha localizado en la región codificante y es de resaltar que no se han identificado SNPs de dichos genes en población mexicana, por lo que es de interés su posible identificación en esta población.

El análisis de genes involucrados en la adipogénesis para identificar polimorfismos de un solo nucleótido en población del estado de Morelos ayudará a identificar variantes genéticas que podrían representar susceptibilidad para el desarrollo de sobrepeso y obesidad. El gen CEBP α , es un factor de transcripción para genes importantes como la adiponectina y la leptina que son imprescindibles para la homeostasis energética y son claves en la diferenciación del adipocito, además de coparticipar con genes relevantes en la adipogénesis y la función del adipocito como PPAR γ y FOXO1, lo que lo hace un excelente candidato para identificar nuevas variantes alélicas que pudieran participar en la

disfunción del adipocito, finalmente es de resaltar que no se han identificado SNPs de este gen en la población mexicana, por lo cual es relevante un estudio de búsqueda de nuevos polimorfismos de un solo nucleótido de este gen en esta población y documentar si existen en el sitio de unión al ADN.

Los estudios realizados en el laboratorio de biología de células troncales de la Facultad de Medicina en Morelos han sido del factor de transcripción de PPAR γ , tanto en su sitio de transactivación como el sitio de unión al ADN. En ambos casos se han encontrado nuevos SNPs con altas frecuencias, lo que establece la posibilidad de un fondo genético diferente para población mexicana; por lo tanto, es conveniente estudiar otros factores de transcripción en enfermedades crónico-degenerativas. Además de ello, el estudio del factor de transcripción CEBP α es de importancia para este grupo de trabajo, debido que hay estudios en curso con otros factores de transcripción como es FOXO1 y PPAR γ , los cuales han mostrado tener una interacción directa con CEBP α . El conocer los polimorfismos de un solo nucleótido puede ser útil para dilucidar la formación de complejos que llevan a cabo el proceso de adipogénesis y de sensibilidad a la insulina.

4. HIPÓTESIS

Existen nuevos polimorfismos de un solo nucleótido del gen CEBP α en el dominio de unión al ADN en voluntarios de 18 a 25 años con sobrepeso u obesidad residentes del estado de Morelos.

5.OBJETIVOS

5.1 Objetivo general

Identificar nuevos polimorfismos de un solo nucleótido en el dominio de unión al ADN del gen que codifica a CEBP α en voluntarios de 18 a 25 años con sobrepeso y obesidad residentes del estado de Morelos.

5.2 Objetivos particulares

- ✓ Identificar jóvenes de 18 a 25 años con sobrepeso y obesidad en las bases de datos de voluntarios del proyecto “Genoma diabetesogénico del estado de Morelos”.
- ✓ Identificar nuevos-SNPs en el dominio de unión al ADN de CEBP α en jóvenes de 18 a 25 años.
- ✓ Identificar la frecuencia de los nuevos polimorfismos de un solo nucleótido en el dominio de unión al ADN de CEBP α en los sujetos participantes.

6. MATERIAL Y MÉTODOS

6.1. Tipo de estudio

Es un estudio transversal descriptivo.

6.2 Criterios de inclusión, exclusión y eliminación

6.2.1 Criterios de inclusión

Muestras de sangre de voluntarios que cumplan con las siguientes características:

- Contar con el consentimiento del voluntario, para la toma de muestras y su autorización para el uso de la misma con fines de investigación.
- Edad: 18 a 25 años mujeres y hombres.
- Residentes en el estado de Morelos.
- Que cumplan con el criterio de sobrepeso u obesidad.
- Cuyas muestras de ADN cumplan con la cantidad suficiente y calidad adecuada para su amplificación.
- Contar con el expediente completo.

6.2.2. Criterios de exclusión

Se excluyeron aquellos participantes que no tuvieron registros completos, es decir que no contenían los datos de la somatometría, sexo, edad o lugar de residencia.

6.2.3. Criterios de eliminación

Muestra de ADN de mala calidad que no permitieron su amplificación y por lo tanto no podrían ser secuenciadas.

6.3 Población de estudio

En el estudio se utilizaron voluntarios que se encontraban en tres bases de datos (B, D y E), como se muestra en la tabla 7. Estas bases de datos contienen información de parámetros bioquímicos y mediciones antropométricas.

Se seleccionaron voluntarios hombres y mujeres que cumplieran con los criterios de sobrepeso y obesidad según los parámetros que determina la OMS. Los voluntarios seleccionados fueron del grupo de edad de 18 a 25 años y residentes del estado de Morelos. Inicialmente se seleccionaron al azar 100 muestras para la determinación de polimorfismos de un solo nucleótido con un número aleatorio obtenido por medio del programa Excel 360. De estas, se secuenciaron 31 muestras para la determinación de SNPs.

6.4 Lugar de obtención de las muestras

Las muestras de sangre y los datos de los voluntarios se reunieron en tres distintos lugares del estado de Morelos. La base de datos B se obtuvo de voluntarios donadores de sangre del hospital “Dr. Rafael Barba Ocampo” del ISSSTE de Cuautla. La base de datos D se obtuvo de estudiantes del segundo semestre de la Facultad de Medicina de la UAEM. Y la base de datos E se obtuvo de estudiantes de la Facultad de Medicina de la UAEM en Cuernavaca, Morelos (Tabla 7).

Tabla 7. Bases de datos utilizadas para el proyecto

Base de datos	Proyecto original	Lugar	Fecha	Muestras utilizadas en el proyecto
B	“Para uso de muestra de sangre en investigación biomédica”	Banco de sangre del hospital “Dr. Rafael Barba Ocampo” del ISSSTE de Cuautla	2008	1
D	Detección oportuna de enfermedades metabólicas	Facultad de Medicina de la UAEM	2014	21
E	Base de datos para identificar el genoma diabetogénico del estado de Morelos	Facultad de Medicina de la UAEM	2018	9

las bases de datos que se utilizaron en este estudio también fueron utilizadas en 4 de los proyectos previos del laboratorio de biología de células troncales, los cuales se mencionan en la figura 5.

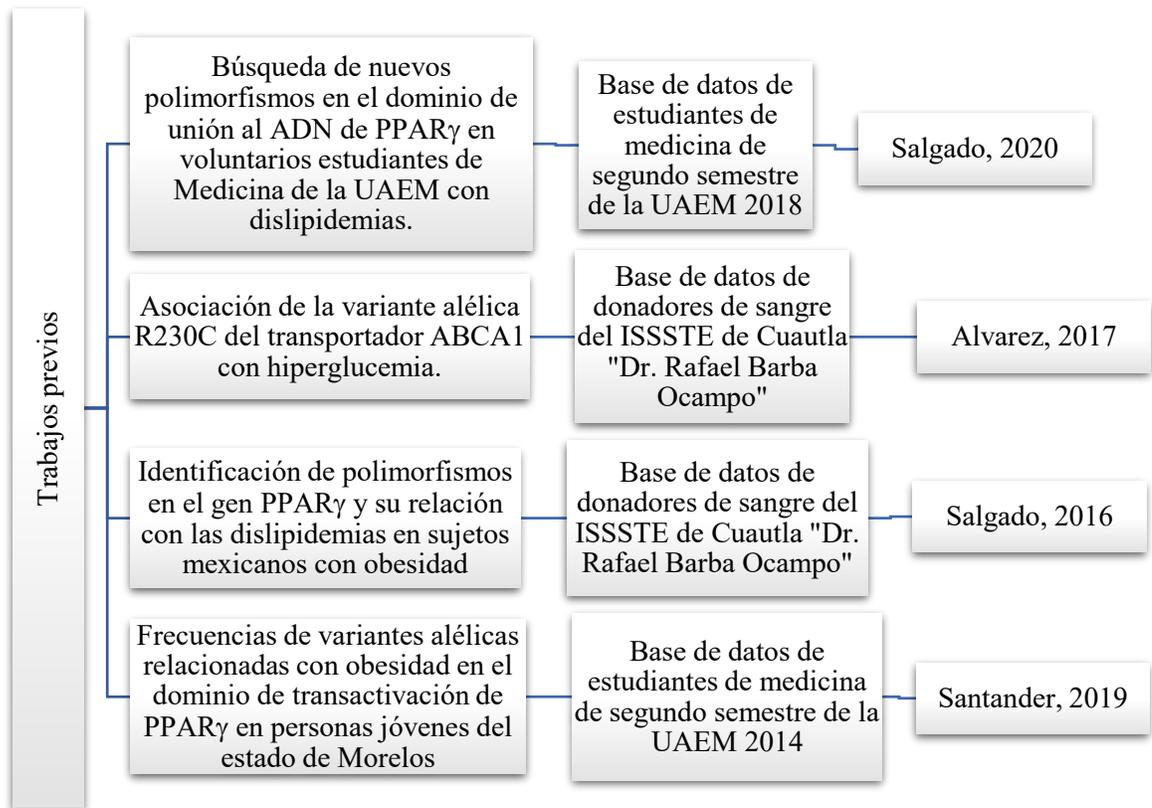


Figura 5. Trabajos previos en donde se han utilizado las muestras del Biobanco B, D y E

6.5 Lugar de estudio

La búsqueda de los SNPs se realizó en el laboratorio 11 de biología de células troncales de la Facultad de Medicina de la UAEM y en la Unidad de Diagnóstico y Medicina Molecular (UDMM) "Dr. Ruy Pérez Tamayo" del Hospital del Niño Morelense (HNM).

6.6. Periodo de estudio

El estudio se realizó de febrero 2019 a enero del 2021.

6.7 Definición de las variables del estudio

Para el análisis de los parámetros sociodemográficos de la población estudiada se utilizaron las variables que se describen a continuación (tabla 8)

Tabla 8. Variables del estudio

Variable	Tipo De Variable	Definición Conceptual	Definición Operacional	Escala De Medición	Indicador
Edad	Cuantitativa	Tiempo que ha transcurrido para un individuo desde su nacimiento.	Años de vida que tiene el voluntario al momento de la toma de muestra Se obtiene de las hojas de registro	De razón	Años
Sexo	Cualitativa	Características biológicas, anatomía del sistema reproductivo y a las características sexuales secundarias	Sexo que ha sido reportado en las hojas de registro.	Nominal	Hombre/mujer
IMC	Cuantitativa	Relación entre peso corporal de la persona en kilogramos dividido entre el cuadrado de su talla en metros al momento de la toma de medidas antropométricas	Índice de masa corporal que se obtuvo a partir de la fórmula matemática de peso en Kilogramos entre talla en metros al cuadrado de los datos obtenidos de la hoja de registro.	De razón	Kg/m ²

Sobrepeso	Cualitativa	Es la condición de aumento de masa corporal a expensas de la acumulación excesiva de grasa que supone un riesgo para la obesidad	Sobrepeso determinado por el IMC establecido con los datos obtenidos por la hoja de registro, que se encuentre en un rango de entre 25 a 29.9 kg/m ² .	Nominal	Presente/Ausente
Obesidad	Cualitativa	Enfermedad caracterizada por el exceso de tejido adiposo en el organismo.	Determinada por el IMC establecido con los datos obtenidos por la hoja de registro, que sea igual o mayor a 30 kg/m ² .	Nominal	Presente/Ausente
SNP	Cualitativa	Variación alélica que corresponde al cambio de una sola base nucleotídica en una secuencia de ADN, que se encuentre presente en al menos el 1% de la población	Polimorfismo detectado por la secuenciación del segmento de unión al ADN del gen que codifica para CEBP□□ identificado por medio del alineamiento múltiple entre la secuencia de referencia y las secuencias obtenidas del ADN de los voluntarios a este estudio.	Nominal	Presente/Ausente

6.8 Procedimientos de laboratorio

6.8.1 Purificación de ADN por medio del método fenol-cloroformo

La purificación de ADN se realizó a partir de la capa leucocitaria. Se extrajeron 400 μL de la capa de leucocitos de la sangre total, y se colocaron en un tubo de 15 mL, se agregaron 9 mL de solución de lisis de eritrocitos y se llevaron a cabo una serie de centrifugaciones a 300g por 5 minutos y lavados con PBS al 1X o medio de cultivo y se formó un pellet. Posteriormente se hizo un conteo de leucocitos para colocar 5 millones de células en un tubo de 2 mL en donde se agregaron 500 μL de solución TES y 12.5 μL de proteinasa, se resuspendió el pellet por agitación suave e incubó por 16 horas a 65°C.⁸⁹

Transcurrido este tiempo, se agregaron 500 μL de fenol y se homogenizó por inversión por 10 minutos. Enseguida se agregaron 500 μL de solución clorofórmica, se mezcló por inversión durante 10 minutos y se centrifugó a 16000 g durante 5 minutos. Se tomaron 650 μL de la fase acuosa con una punta azul recortada y se colocó en un nuevo tubo de 2 mL, aquí se encontró el ADN y el ARN. Después se agregaron 500 μL de solución clorofórmica y se centrifugó nuevamente, se volvieron a extraer 650 μL de la fase acuosa. Se realizó otra extracción y al final se tomaron 550 μL de la fase acuosa y se colocaron en un tubo nuevo, este tubo debía contener entre 1-5 μg de ADN.⁸⁹

Posteriormente el ADN se precipitó agregando 20 μL de NaCl 5M y 1 mL de etanol absoluto a -20°C, se observó una malla en el tubo que corresponde al ADN. Se dejó toda la noche a -70°C, después se centrifugó a 16000 g por 10 minutos a 4°C y se decantó el sobrenadante. Después se agregó etanol al 70% a -20°C y se volvió a centrifugar, se decantó el sobrenadante y se cubrieron los tubos con Parafilm. Para secar la muestras se realizaron tres agujeros en el parafilm, se colocaron en la incubadora a 37°C La muestra después se resuspendió en 200 μL de TE (pH 7.4). Se calentó la muestra 1 hora en baño seco a 65°C para que se resuspendiera totalmente el pellet.⁸⁹

6.8.2 Evaluación de la concentración de ADN y de la pureza

De las 100 muestras elegidas, se evaluó la concentración y la pureza de ADN por medio de espectrofotometría UV/VIS utilizando un (Biodrop). Para utilizar el equipo se realizó limpieza con 50 μL de agua desionizada, seguido de una calibración del equipo con

el blanco, en este caso se utilizó la solución TE, que es el vehículo se encontraba disuelto el ADN. Se midió la relación 260/280 que mostraba la contaminación por proteínas y la relación 260/230 que indicaba la contaminación con fenoles y sales provenientes del proceso de extracción de ADN. Para que el ADN se considerara puro debía tener un valor en la relación 260/280 mayor a 1.8 y un valor mayor de 2 en la relación 260/230.⁹⁰

6.8.3 Integridad del ADN

La integridad de ADN se analizó realizando una electroforesis en gel de agarosa al 1.5% con bromuro de etidio. Para esto se cargaron 2µL de ADN (0.1 µg/µL) + 8µL de TE +3µL de azul de bromofenol. La corrida electroforética se realizó a180V durante 45 minutos. Posteriormente se visualizó en el transiluminador de luz ultravioleta.⁸⁹

6.8.4 Evaluación de la amplificación: PCR

Para determinar si era posible amplificar el ADN, se realizó la amplificación del gen constitutivo GAPDH por PCR de punto final semicuantitativo con los oligonucleótidos de GAPDH en una reacción de 50 µL en donde se colocaron los reactivos indicados en la Tabla 9. El tamaño del fragmento de amplificación fue de 307 pb.

Tabla 9. Reactivos utilizados en PCR semicuantitativo de GAPDH

Reactivos	1 Rx (50 µl)
Agua mili Q filtrada	28.5 µl
Solución amortiguadora Taq ADN polimerasa 1X	5 µl
MgCl ₂ 1.8 mM	3 µl
dNTPs 10 mM	1 µl
Oligonucleótido sentido GAPDH 0.1 µg/µl	1 µl
Oligonucleótido anti sentido GAPDH 0.1 µg/µl	1 µl
Taq ADN polimerasa	0.5 µl
ADN problema 0.1 µg/µl	10 µl

Después se realizó una electroforesis en gel de agarosa al 2% en donde se cargaron 10µL de la muestra y 3 µL de azul de bromofenol y posteriormente se observó en el transiluminador de luz UV. Los resultados mostraron una banda de 307 pb lo que indicó que las muestras podían ser utilizadas como templado para realizar la reacción en cadena de la polimerasa (PCR).

6.8.5 Diseño de oligonucleótidos

Para llevar a cabo la secuenciación del dominio de unión al ADN del gen de CEBP α , se diseñaron oligonucleótidos para aislar el fragmento genómico. Un par de oligonucleótidos (1 y 3) se diseñó utilizando el programa informático Primer Blast del NCBI,⁹¹ en donde se usó la secuencia de CEBP α con el número NG_012022.1 del GenBank. En el caso de los pares de oligonucleótidos 1 y 3 se buscó que tuvieran las mejores condiciones tomando en cuenta que el tamaño del oligonucleótido fuera de 20 a 25 bases, la temperatura de fusión (T_m) no debía variar de más de 2°C entre ellas y debe hallarse entre 55°C y 72°C, con un contenido de guaninas-citosinas entre 40 y 60%. El par de oligonucleótidos número 2 se obtuvo de Akin y colaboradores⁹² donde se determinaron mutaciones para leucemia mieloide aguda. Para evaluar la formación de homodímeros, heterodímeros y horquillas se utilizó el programa Oligo Analyzer. Se aceptó cuando los oligonucleótidos tuvieran un ΔG menor de -10Kcal/mol (Tabla 10).

Tabla 10. Oligonucleótidos diseñados para el sitio de unión al ADN del gen CEBP α .

OLIGONUCLEÓTIDOS							
Par	Nombre	Secuencia	Tamaño Del Oligonucle ótido	Región	Tm	% GC	Tamaño Del Producto PCR
1	F1	GCGAGGAGGATGA AGCCAAGCAGCT	25	5604-5628	67	60	561
	R1	TGACCAAGGAGCTC TCTGGCAGCT	24	6141-6164	66	58	
2	F2	CCTTCAACGACGAG TTCCTG	20	5325-5344	57	55	638
	R2	CTCGTTGCTGTTCTT GTCCA	20	5943-5962	54	50	
3	F3	CATGCACCTGCAGC CCGGTCA	21	5761-5781	64	67	570
	R3	TGACCAAGGAGCTC TCTGGCAGCT	23	6308-6330	65	65	

Posteriormente, se realizó un análisis en el programa BLAST,⁹³ en el cual se analizó si los oligonucleótidos eran específicos para CEBP α y que no fueran complementarios para otros genes.

6.8.6. Estandarización de oligonucleótidos en PCR punto final

Se tuvieron 3 pares de oligonucleótidos, para dos de ellos se realizaron curvas de temperatura de alineamiento y concentración de MgCl₂ para conocer las condiciones óptimas para la amplificación por PCR de punto final. Para determinar la concentración de MgCl₂ se evaluó un gradiente de concentración de MgCl₂ que fue de 0.5 mM a 4 mM, mientras que para la temperatura de alineamiento se emplearon 12 puntos en un rango entre

54 y 68 °C con ayuda de un termociclador de gradiente de temperatura, como se observa en la Tabla 11. En cada reacción se agregaron 0.1 µg/µL de cada oligonucleótido, 10mM de dNTPs y 1 µg de ADN. Para visualizar el fragmento de amplificación se realizó una electroforesis en gel de agarosa al 2% en donde se cargaron en cada pozo 10 µL de la muestra y 3 µL de azul de bromofenol, en el primer carril se agregaron 3µL de marcador de peso molecular de 100 pares de bases. La corrida electroforética se llevó a cabo a 220 V por 40 minutos. (Tabla 11)

Tabla 11. Curva de estandarización de los oligonucleótidos para obtener las condiciones óptimas para la amplificación por PCR punto final de ADN

		TEMPERATURAS											
		54°C 1	54.9°C 2	55.5°C 3	57.4°C 4	59.4°C 5	61.5°C 6	62.4°C 7	64.2°C 8	65.8°C 9	67.1°C 10	67.5°C 11	68°C 12
Concentración de MgCl ₂ (Mm)	0.5 A	1A	2A	3A	4A	5A	6A	7A	8A	9A	10A	11A	12A
	1 B	1B	2B	3B	4B	5B	6B	7B	8B	9B	10B	11B	12B
	1.5 C	1C	2C	3C	4C	5C	6C	7C	8C	9C	10C	11C	12C
	2 D	1D	2D	3D	4D	5D	6D	7D	8D	9D	10D	11D	12D
	2.5 E	1E	2E	3E	4E	5E	6E	7E	8E	9E	10E	11E	12E
	3 F	1F	2F	3F	4F	5F	6F	7F	8F	9F	10F	11F	12F
	3.5 G	1G	2G	3G	4G	5G	6G	7G	8G	9G	10G	11G	12G
	4 H	1H	2H	3H	4H	5H	6H	7H	8H	9H	10H	11H	12H

Debido a que no se obtuvo producto de amplificación se utilizaron aditivos que favorecen la amplificación por PCR en secuencias ricas en GCs. Los aditivos utilizados incluyeron DMSO⁹⁴ a una concentración del 5%, dimetilformamida y formamida al 1.25%⁹⁵, etilenglicol al 1M⁹⁶ y propilenglicol al 0.8M⁹⁶. Se utilizaron diferentes combinaciones de oligonucleótidos además de utilizar distintos aditivos en la reacción de PCR. Se muestran las combinaciones y los aditivos utilizados en la Tabla 12.

Tabla 12. Combinaciones y aditivos utilizados para estandarización de la amplificación por PCR utilizando diferentes oligonucleótidos.

OLIGONUCLEÓTIDOS										
PAR	NOMBRE	SECUENCIA	TAMAÑO PRODUCTO PCR	CURVA ESTÁNDAR	DMSO	FORMA MIDA	DIMETIL FORMAMIDA	ETILEN GLICOL	PROPILEN-GLICOL	KIT
1	F1	GCGAGGAGGATGAAGCCAAGCAGCT	561 pb	✓	✓	✓	✓	✓	✓	
	R1	TGACCAAGGAGCTCTCTGGCAGCT								
2	F2	CCTTCAACGACGAGTTCCTG	638pb	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓
	R2	CTCGTTGCTGTTCTTGCCA								
3	F3	CATGCACCTGCAGCCCGGTCA	570 pb	✓						
	R3	TGACCAAGGAGCTCTCTGGCAGCT								
4	F1	GCGAGGAGGATGAAGCCAAGCAGCT	359 pb	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓
	R2	CTCGTTGCTGTTCTTGCCA								
5	F2	CCTTCAACGACGAGTTCCTG	840 pb	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓
	R1	TGACCAAGGAGCTCTCTGGCAGCT								

Como no se obtuvo producto de amplificación con el protocolo de las curvas de estandarización, se llevó a cabo una amplificación con el KIT comercial *Pwo SuperYield DNA Polymerase, dNTPack de Roche*. Se realizó el PCR de acuerdo con las recomendaciones de los fabricantes y se utilizaron los reactivos de la tabla 13 para su amplificación.

Tabla 13. Mix del Kit Pwo SuperYield DNA Polymerase, dNTPack de Roche

Agua milliQ	13.75 μL
Solución tampón de la enzima, 10× conc. con Mg^{2+}	2.5 μL
Mix de nucleótidos 10mM	0.5 μL
Oligonucleótido sentido 0.1 mM	0.25 μL
Oligonucleótido antisentido 0.1mM	0.25 μL
Solución tampón para regiones ricas en GCs 5X	5 μL
Pwo SuperYield DNA Polymerase 5U/μL	0.25 μL
DNA	2.5 μL
TOTAL	25 μL

Para el programa de amplificación del termociclador, se utilizó una desnaturalización inicial de 95°C por 3 minutos, seguido de 40 ciclos de 95°C durante 45 segundos en el proceso de desnaturalización, 60°C por 30 segundos de alineamiento, y 72°C durante 45 segundos en el proceso de elongación con un ciclo final de 72°C por 7 minutos.

Para analizar la amplificación se realizó un corrimiento de las muestras mediante una electroforesis en un gel de agarosa al 2% con una corrida electroforética a 220 V por 45 minutos.

6.8.7 PCR punto final de las muestras

El PCR punto final se realizó con los oligonucleótidos F2 y R2 debido a que durante el proceso de estandarización se observó que no tenían productos inespecíficos. El procedimiento se realizó utilizando el Kit *Pwo SuperYield DNA Polymerase, dNTPack de laboratorio Roche* según las recomendaciones del fabricante. Se realizó PCR punto final para 100 muestras. Los ciclos de PCR fueron los siguientes: se utilizó una desnaturalización inicial de 95°C por 3 minutos, seguido de 40 ciclos de 95°C durante 45 segundos en el proceso de desnaturalización, 60°C por 30 segundos de alineamiento, 72°C durante 45 segundos en el proceso de elongación y un ciclo final de 72°C por 7 minutos.

Posteriormente se realizó un corrimiento electroforético de un gel de agarosa al 2% para evaluar que los productos de amplificación correspondían al tamaño esperado de 638 pb. Se utilizó el marcador de peso molecular Biodyne de 100 pb. El gel se tiñó con bromuro de etidio. Se hizo una corrida electroforética durante 45 minutos a 220 V y se visualizó el gel en un transiluminador de luz UV.

6.8.8 Purificación del producto de PCR.

Para llevar a cabo la secuenciación de los productos de PCR, se purificaron los productos de amplificación de PCR por la técnica de purificación en gel. El proceso de purificación se realizó para 31 muestras de los 100 PCR realizados. Para esto se colocaron los productos de PCR en un gel de agarosa al 1.5% y se corrieron durante 30 minutos a 80V. Con ayuda de un transiluminador se cortó el fragmento de interés de 638 pb en pedazos pequeños para colocarlos en tubos de 1.5 mL. Se agregó fenol dependiendo el peso que se obtuvo del gel, que se calculó con la diferencia del tubo vacío y con el gel y se multiplicó 1000. Después el tubo con la mezcla se colocó a -20°C por 20 minutos y se centrifugó a 12000 rpm por 5 minutos a temperatura ambiente. El sobrenadante se colocó en un tubo limpio y se agregó 1 mL de etanol absoluto y una décima parte del sobrenadante de NaCl 5M, se colocó a -80°C por 15 minutos para precipitar el producto de PCR, después se centrifugó a 12 000 rpm por 5 minutos a temperatura ambiente. El pellet obtenido se lavó con 200 µL de etanol al 70%, se centrifugó a 12 000 rpm por 5 minutos, se decantó y se secó utilizando el MiVac a 42°C por 15 minutos. El pellet se suspendió el 15µL de agua

milliQ Q, se dejó resuspender por una noche y posteriormente se leyó su concentración y calidad en el Biodrop.

6.8.9 Determinación del tamaño del producto de PCR purificado.

El tamaño del producto de PCR purificado se comprobó, lo cual se hizo mediante un gel de agarosa al 2% teñido con bromuro de etidio. Se cargaron 100 ng del producto purificado de cada muestra y 3 μ L de azul de bromofenol. La corrida electroforética se realizó durante 45 minutos a 220 V y después se visualizó en un transiluminador de luz UV.

6.8.10 Secuenciación

La secuenciación de los productos de amplificación fue realizada por la Unidad de Síntesis y Secuenciación del ADN del Instituto de Biotecnología de la UNAM. Se utilizó el método de Sanger para la secuenciación en donde se utilizaron didesoxinucleótidos fluorescentes y un secuenciador automático de ADN (Applied Biosystems, modelo 3130xl).

6.8.11 Evaluación de la calidad de la secuencia

Una vez que se obtuvieron las secuencias por parte de la unidad de secuenciación se evaluó la calidad de la secuencia por medio de un electroferograma utilizando el programa Sequence scanner V2.

Para determinar la calidad y la confiabilidad de la secuencia se tomaron en cuenta la resolución de los picos, la uniformidad en la separación entre picos, las unidades de fluorescencia relativa (RFUs), el valor QV que es la probabilidad de que fuese un error, Para utilizar la secuencia era necesario que el 70% debía tener un QV por arriba de 20 y RFUs entre 500 y 1000. Para determinar los SNPs se utilizaron las reglas de la Unión Internacional de Química Pura y Aplicada (IUPAC), lo que se muestra en la tabla 14.

Tabla 14. Nomenclatura IUPAC para nucleótidos

IUPAC Código nucleótido	Base
A	Adenina
C	Citosina
G	Guanina
T o U	Timina o Uracilo
R	A o G
Y	C o T
S	G o C
W	A o T
K	G o T
M	A o C
B	C o G o T
D	A o G o T
H	A o C o T
V	A o C o G
N	Cualquier base
. o -	Espacio

Obtenido modificado de bioinformatics.org

6.8.12 Alineamiento de secuencias con del dominio de unión a ADN del gen CEBP α

Se realizó un alineamiento de las secuencias obtenidas con la secuencia del gen CEBP α reportada. Este se realizó con el programa BLAST para confirmar que se trataba del fragmento del sitio de unión al ADN de CEBP α y que corresponda al número de RefSeqGene NG_012022.1

6.8.13 Alineamiento múltiple de las secuencias de nucleótidos.

El alineamiento múltiple se realizó utilizando el programa CLC Sequence viewer 2, se alinearon las secuencias de las muestras de 31 voluntarios con la secuencia de referencia de CEBP α NG_012022.1. Este alineamiento permitió identificar claramente las diferencias que existen entre las secuencias, ya sea el cambio de un nucleótido, la inserción y la supresión de nucleótidos que no coincidan con la secuencia de referencia.

6.8.14 Predictor de daño a la estructura y función de la proteína.

Para determinar el daño de la estructura de la proteína se utilizó el software PolyPhen-2 ⁹⁷, este software permite determinar el posible impacto que se tiene por la sustitución de aminoácidos en la estructura de la proteína.

6.9 Análisis Estadístico

Se integró una base de datos con las variantes consideradas para el estudio, en el programa Excel 365. Se utilizó estadística descriptiva; para las variables edad e IMC se calcularon media, moda, mediana y medidas de dispersión (desviación estándar, varianza, rango intercuartil y límites del rango intercuartil). Para las variables cualitativas (sexo, obesidad, sobrepeso) se calcularon proporciones. El análisis se realizó con el programa Excel 365.

7. ASPECTOS ÉTICOS

El presente proyecto cumplió con todos los lineamientos legales y normativos para la investigación en Salud.

Todas las prácticas clínicas en investigación cumplieron con el estándar internacional ético y de calidad; el estudio proporcionó garantía pública de los derechos, la seguridad y el bienestar de los participantes, y fue acorde a los principios que tienen origen en la declaración de Helsinki.

Además de esto, se respetó el marco jurídico en investigación en salud, la ley general de salud, que en su título quinto está relacionado con la investigación para la salud, Se acató el reglamento en materia de investigación para la salud y la NOM-012-SSA3-2012 que menciona los criterios para la ejecución de proyectos de investigación en seres humanos.

En la investigación que se realizó, a los voluntarios se les dio y leyó una carta de consentimiento informado en donde se informó el cómo se realizaría la prueba, los riesgos y el cómo se utilizarían sus muestras, al igual que se mencionó que se mantendría su confidencialidad en todo momento,

8. RECURSOS

8.1 Recursos humanos

Las muestras que se utilizaron las proporcionó el laboratorio 12 de la Facultad de Medicina de la UAEM. La extracción y purificación de las muestras de la serie B fueron realizadas por miembros del Laboratorio de Medicina Transfusional y miembros del Laboratorio de Biología de Células Troncales de la Facultad de Medicina de la UAEM. Para las series D y E, se realizó la extracción y purificación por miembros del laboratorio 11 de Biología de Células Troncales de la Facultad de Medicina de la UAEM.

Los oligonucleótidos utilizados además de la secuenciación del fragmento de unión al ADN se mandaron a sintetizar en la unidad de síntesis y secuenciación del Instituto de Biotecnología de la UNAM.

8.2 Recursos materiales

Tabla 15. Recursos materiales

Instalaciones	Laboratorio 11 de “Biología de células trocales de la Facultad de Medicina de la UAEM
	Unidad de diagnóstico y medicina molecular. “Dr. Ruy Pérez Tamayo” de Hospital del Niño Morelense (HNM)
Instrumentos	Biodrop
	Termociclador
	Cámara de electroforesis
	Transiluminador
	Savant
Materiales y reactivos	Agarosa
	Amplificasa
	Agua MilliQ
	Buffer Amplificasa
	Buffer de carga

	Buffer de corrida TBE
	dNTPs (Nucleótidos)
	Etanol absoluto
	Etanol al 70%
	Fenol
	Marcador de peso molecular 100pb
	MgCl ₂
	Oligonucleótidos CEBP α
	Oligonucleótidos GAPDH
	Tubos para PCR
	KIT <i>Pwo SuperYield DNA Polymerase</i> , <i>dNTPack de laboratorio Roche</i>

8.3 Recursos financieros

Tabla 16. Recursos financieros

Servicio	Costo unitario	Costo total
Secuenciación	10 USDs	1000 USDs de 100 muestras
Síntesis oligonucleótidos	0.70 USDs	100.80 USDs de 3 pares de oligonucleótidos

9. RESULTADOS

9.1 Población de estudio

De los 31 voluntarios cuyas muestras fueron analizadas para la búsqueda de SNPs, 18(58%) correspondieron a mujeres y 13 (42%) a hombres (figura 6), con edades de 18 a 25 años, media de 20.2 (D.E \pm 1.8), mediana de 20 años, rango intercuartil de 2, con límites de este rango 21 y 19 años,

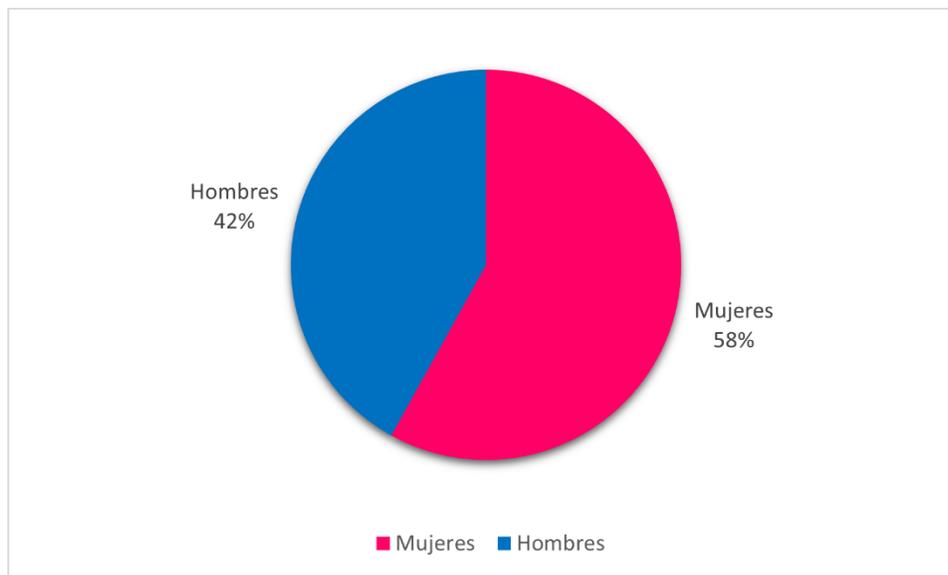


Figura 6. Porcentaje de hombres y mujeres presentes en la población estudiada.

En cuanto al IMC de los voluntarios analizados, la media fue de 28.7 kg/m² (D.E= \pm 3.0) con valor mínimo 25.1 y máximo 36 kg/m², mediana de 27.5, rango intercuartil 4.2 y límites de éste 30.7 y 26.5. En mujeres, el valor mínimo fue 25.1 kg/m² y el máximo 35.2 kg/m², la media fue 28.3 kg/m² (DE= \pm 2.7), con mediana de 27.4, rango intercuartil 3 y límites de 29.5 y 26.5. Para los hombres, los valores mínimo y máximo fueron 25.1 kg/m² y 36 kg/m², la media 29.1 kg/m² (DE= \pm 3.5), la mediana 28.1, límites del rango intercuartil 32.7 y 26.2 con su rango correspondiente de 6.5 (tabla 17).

Tabla 17. Valores de IMC por sexo

	m	DE	Me	Valor mínimo	Valor máximo	Q3	Q1
Total	28.7	3.0	27.5	25.1	36.0	30.7	26.5
Mujeres	28.3	2.6	27.4	25.1	35.2	29.5	26.5
Hombres	29.1	3.5	28.1	25.1	36.0	32.7	26.2

Los valores se expresan en Kg/m², se presentan en medias (m), desviación estándar (DE), mediana (Me), primer cuartil (Q1) y tercer cuartil (Q3)

En la población de estudio, 74.2% tuvo sobrepeso y 25.8% obesidad. Con respecto a mujeres el 69.2% tuvo sobrepeso y 30.8% obesidad. En hombres, los porcentajes respectivos fueron 77.8% y 22.2% (Figura 7).

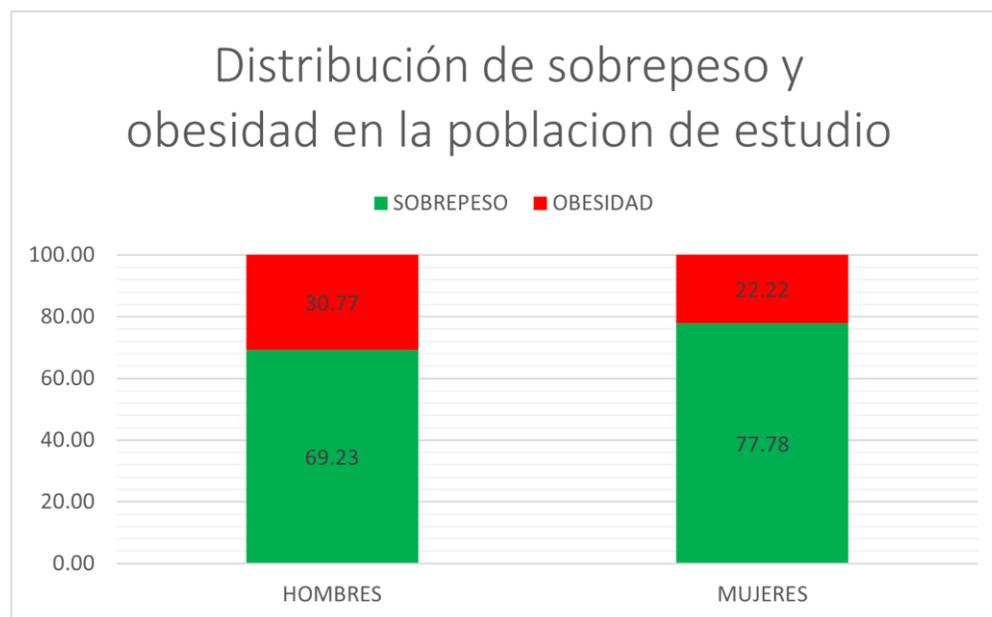


Figura 7.. Distribución de sobrepeso y obesidad en la población de estudio.

9.2 Evaluación de la concentración de ADN y pureza

Se evaluó la concentración del ADN y la pureza de las muestras almacenadas de las 3 bases de datos, el promedio de la relación 260/280 fue de 1.836, el valor mínimo que se obtuvo fue de 1.327 y el máximo de 2.298. para determinar la pureza la relación 260/280,

se consideró un valor de pureza adecuada mayor a 1.8 y lo presentaron el 55% de las muestras, el valor de pureza aceptable debía ser mayor a 1.6 y el 34% de las muestras presentaron esos valores. Se presentó contaminación en el 11% de las muestras (tabla 18).

En cuanto a la relación 260/230 el promedio fue de 0.827, con un valor mínimo de 0.073 y un máximo de 3.79. En esta relación se considera contaminación por sales o fenoles cuando es menor a 1.5, como se puede observar en la tabla 18 el 66% de las muestras estaba contaminada; esto puede deberse a condiciones de almacenamiento además de que puede influir la heterogeneidad en la toma de las muestras y que en el proceso de purificación de ADN de la serie B se utilizó bolsas con muestras leucocitarias de 9 años de almacenamiento.

Tabla 18. Pureza y contaminación de muestras.

A260/280			A260/230		
PROMEDIO	1.836		PROMEDIO	0.827	
DESVIACIÓN	0.207		DESVIACIÓN	0.849	
MÍNIMO	1.327		MÍNIMO	0.073	
MÁXIMO	2.298		MÁXIMO	3.791	
A260/280	F	%	A269/230	F	%
PUREZA ADECUADA	55	55	PUREZA ADECUADA	30	30
PUREZA ACEPTABLE	34	34	PUREZA ACEPTABLE	4	4
CONTAMINACIÓN DE PROTEÍNAS	11	11	CONTAMINACIÓN POR SALES O FENOLES	66	66
TOTAL	100	100	TOTAL	100	100

9.3. Evaluación de la amplificación: PCR

Después de la determinación de la integridad de las muestras, se requirió evaluar la capacidad de amplificación de las muestras de ADN, por lo cual se realizó un PCR punto final con oligonucleótidos de GAPDH. Como control positivo se utilizó un ADN purificado que ya había sido anteriormente estandarizado, y de control negativo se empleó agua inyectable. Para las 3 series (B, D y E) se logró la amplificación del 100% de las muestras, por lo tanto, el ADN contó con la calidad suficiente para realizar PCR punto final a pesar

del nivel de contaminación mostrado de proteínas, sales o fenoles además de que ya se había realizado el análisis de la degradación.

9.4 Estandarización de PCR

Para la estandarización como se mencionó en la metodología se utilizaron curvas de estandarización para determinar cuál era la mejor condición para la amplificación, debido a que es una secuencia complicada de amplificar debido a que es un gen con más del 70% de guaninas y citosinas, no se obtuvo producto de amplificación con el protocolo que se había estado empleando en el laboratorio, por lo cual se realizó una búsqueda en la literatura de PCR en secuencias ricas en Guaninas y citosinas y se encontró que se utilizaban diferentes aditivos y Kits de amplificación, por lo que se realizaron diferentes curvas con aditivos como se mencionó en la metodología.

Al no obtener producto de amplificación en ninguna curva y con ningún aditivo se realizaron tres PCR con el kit *Pwo SuperYield DNA Polymerase, dNTPack* que cuenta con una enzima recombinante Pwo DNA polimerasa y tiene una solución tampón que ayuda a que la enzima tenga mayor rendimiento y fidelidad. Además de que tiene una buena estabilidad térmica, su vida media es de más de 2 horas a más de 100°C por lo que se puede utilizar en condiciones mayores de 95°C que son las que se requieren utilizar en este gen. A diferencia de la enzima que se había utilizado con anterioridad la Amplificasa de Biotecmol, esta enzima tiene una vida media de 10 minutos a 98°C.⁹⁷

La primera reacción fue con los oligonucleótidos F2 y R2, la segunda reacción fue con el oligonucleótido F2 y el oligonucleótido R1, y la tercera reacción fue el oligonucleótido F1 y el oligonucleótido R2, se siguió el protocolo del fabricante y se obtuvo producto de amplificación en las tres combinaciones de oligonucleótidos; esto indica que el diseño de los oligonucleótidos era correcto y el tener una enzima que sea de alta estabilidad, mayor rendimiento y fidelidad era necesaria para la amplificación del sitio de unión al ADN de CEBP α .

En la figura 8 se puede observar el gel de agarosa de las PCR realizadas; en las tres condiciones hubo amplificado. En el carril 2 el producto de amplificación era de 638 pb, y se puede observar una banda muy definida e intensa, esto nos indica una gran cantidad de producto de amplificación del tamaño aproximado esperado. En el carril 3 el producto de

amplificación esperado es de 840 pb y se puede observar que también se encuentra el producto deseado, se nota varias bandas debajo de los 300 pb por lo que indica que hubo productos inespecíficos y se nota también algunas bandas por debajo de los 100 pb eso indica que son dímeros de iniciadores. En el carril 4 el producto de amplificación esperado es de 359 pb y se puede observar una banda definida e intensa en ese tamaño, pero además se observan diferentes bandas por debajo de los 300 pb lo que nos indica inespecificidades al igual que dímeros de iniciadores.

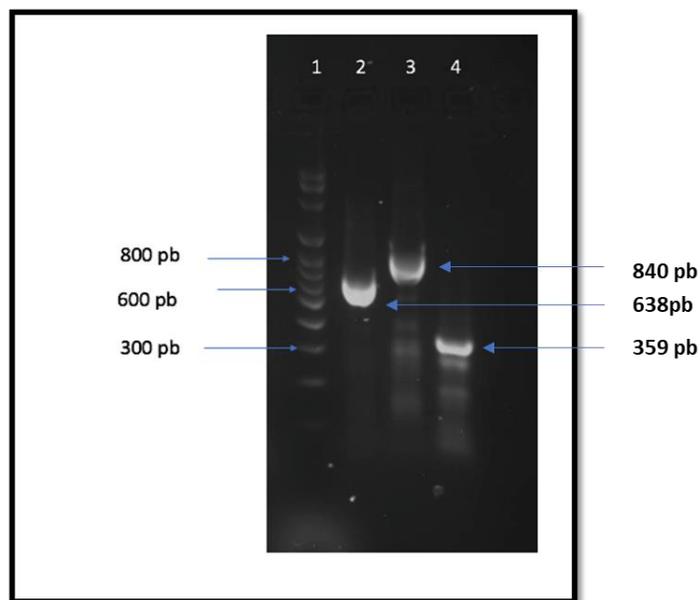


Figura 8. Gel de agarosa al 2% de productos de amplificación con el kit comercial *Pwo SuperYield DNA Polymerase, dNTPack*. Carril 1, marcador de peso molecular de 100 pb. Carril 2, oligonucleótidos reportados (639 pb). Carril 3, oligonucleótido sentido reportado y oligonucleótido antisentido diseñado (840 pb). Carril 4, oligonucleótido sentido diseñado y oligonucleótido antisentido reportado (359 pb).

Por consiguiente, las condiciones en las que se realizó la amplificación de las muestras para la determinación de SNPs de CEBP α fueron temperatura de alineamiento 60°C, con el Kit *Pwo SuperYield DNA Polymerase, dNTPack*, utilizando los oligonucleótidos reportados ya que con este par no se observaron inespecificidades ni dímeros de iniciadores.

9.5. PCR punto final de las muestras

Una vez realizado el PCR punto final se realizó un gel de agarosa al 2% para determinar si hubo producto de amplificación. En la figura 9 hay una imagen representativa de 10 muestras utilizadas en el proyecto con sus respectivos controles positivo y negativo,

se puede observar que el tamaño corresponde a 638 pb que es el tamaño esperado y se observa bien definida. (Figura 9). Por consiguiente, se pudo seguir el proceso de purificación para su posterior secuenciación.

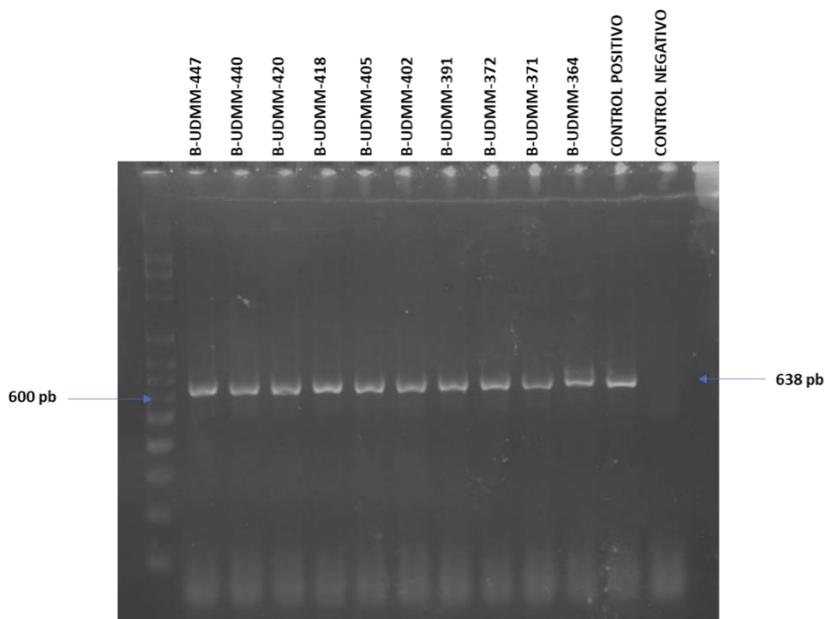


Figura 9. Productos de PCR punto final del gen *CEBP α* a partir de muestras de ADN de la base de datos B. Gel de agarosa al 2%. Se colocaron 3 μ L de muestra, 3 μ L de buffer de carga. La corrida electroforética se realizó a de 220 V por 40 minutos.

9.6 Purificación del producto de PCR

Se llevó a cabo la purificación de 31 muestras de ADN, por el método de purificación en gel y extracción por fenol de los productos de PCR de *CEBP α* . Como se muestra en la tabla 19 para determinar la calidad de las muestras purificadas, se obtuvieron los datos de la relación 260/280, 260/230 y la concentración de éstas; en la relación A260/280 el promedio fue de 1.440, con un valor mínimo de 1.233 y un máximo de 2.056. En cuanto a pureza adecuada solo el 2.88% lo obtuvo y el 19.44% tuvo una pureza aceptable, el 77.78% de las muestras mostraban una contaminación con proteínas. En cuanto a la relación 260/230 el promedio fue de 1.283 con un valor mínimo de 0.367 y un máximo de 2.074, el 8.33% de las muestras tiene una pureza adecuada, el 11.11% tuvo una relación adecuada y el 80.56% estuvo contaminada con sales o fenoles. En cuanto a la concentración, en 100% de las muestras se obtuvo la concentración necesaria para la secuenciación.

Tabla 19.. Pureza y contaminación de muestras purificadas del proyecto.

A260/280			A260/230		
PROMEDIO	1.440		PROMEDIO	1.283	
DESVIACIÓN	0.195		DESVIACIÓN	0.367	
MÍNIMO	1.233		MÍNIMO	0.142	
MÁXIMO	2.056		MÁXIMO	2.074	
A260/280	F	%	A269/230	F	%
PUREZA ADECUADA	1	2.78	PUREZA ADECUADA	3	8.33
PUREZA ACEPTABLE	7	19.44	PUREZA ACEPTABLE	4	11.11
CONTAMINACIÓN DE PROTEÍNAS			CONTAMINACIÓN POR SALES O FENOLES		
	28	77.78		29	80.56
TOTAL	36	100	TOTAL	36	100

9.7. Determinación del tamaño del producto de PCR purificado

Después de la cuantificación y la determinación de la pureza de los productos de PCR de CEBP α , se tenía que comprobar que el tamaño correspondiera a los 638 pb y que el producto de PCR estuviera íntegro. Para esto, se realizó un gel de agarosa al 2% y se cargaron 100 nanogramos por muestra. En la figura 10 se muestra un ejemplo de 8 de las muestras, en donde se puede observar que todos los casos tuvieron una banda bien definida de 638 pb y no hubo degradación. Por lo cual pudieron ser utilizados para su secuenciación.

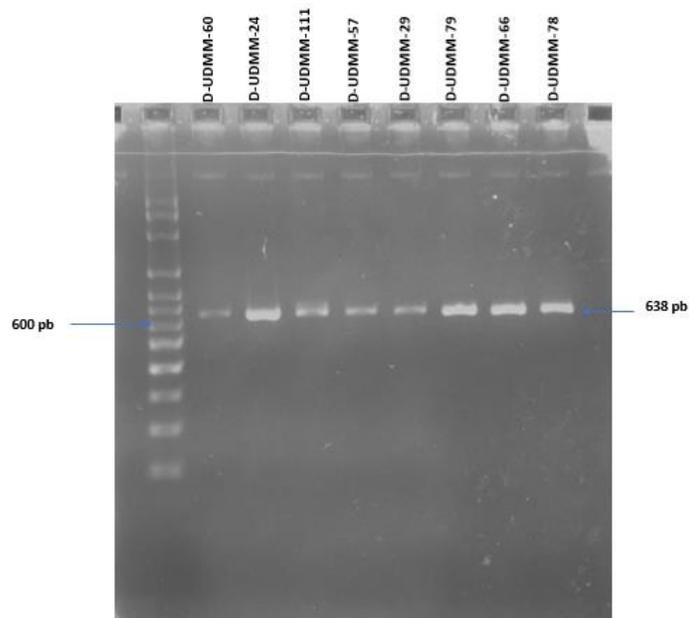


Figura 10. Gel de agarosa de productos de purificación de PCR del gen CEBP α

9.8 Secuenciación

Después de conocer la calidad de los productos de PCR purificados, se enviaron para su secuenciación 31 muestras a la unidad de síntesis y secuenciación de ADN del Instituto de Biotecnología de la UNAM, campus Morelos. Se enviaron con oligonucleótido F2, R2 y F3 anteriormente señalados. En las secuencias con F2 y R2 no se obtuvieron secuencias de alta calidad debido a que se encuentran en zonas complicadas debido a la formación de homodímeros de la secuencia y su alto porcentaje de guaninas y citosinas; En cuanto al oligonucleótido F3 se eligió debido a que es el oligonucleótido más cercano a la región de unión al ADN del gen CEBP α , con este oligonucleótido se lograron secuencias de buena calidad.

9.9. Evaluación de la calidad de la secuencia

Se llevó a cabo la evaluación de la calidad de las secuencias obtenidas por medio del software Sequence Scanner v2. En la figura 11 se puede observar un ejemplo de la secuencia D-UDMM-075 en donde se muestra el valor de QV, en color azul se observan las bases que están por arriba de 20, en rojo las que están por debajo, en este caso, a pesar de que hay bases por debajo de 20 los picos se muestran bien definidos y por arriba de 500 RFUs, también se puede observar cómo se visualiza una variante genética en el

electroferograma en donde hay un solapamiento en una misma posición, en este caso se trata de una variante heterocigota, porque se observan dos picos en una posición, cuando solo hay un cambio en la secuencia sin la presencia de dos picos se trata de una variante alélica homocigota..

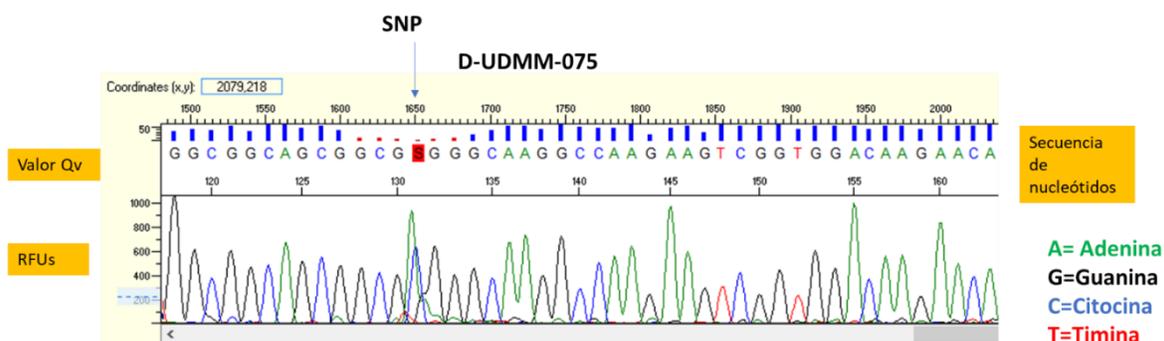


Figura 11. Electroferograma de la secuencia D-UDMM-075. La flecha azul indica un polimorfismo C >A con código IUPAC "S". Las barras QV con valores >20 se presentan en la parte superior de color azul cuando son mayores de 20 y rojos menores de 20. Los colores de los picos corresponden a un nucleótido: verde para Adenina, negro para Guanina, azul para Citocina y rojo para Timina. Las RFUs (Unidades Relativas de Fluorescencia) tienen valores mayores de 500. El programa utilizado fue Sequence Scanner v.2.

De las 31 secuencias se obtuvieron picos bien definidos, sin solapamiento entre ellos. Como se puede observar en la tabla 20, el promedio de bases que obtuvieron un QV por encima de 20 fueron 128, el valor mínimo fue de 72 y el máximo de 142 pb, el porcentaje de bases confiables fue de 89.67%, el mínimo de 72.59% y el máximo de 97.93% y las bases que pudieron ser leídas fueron de 143.1 pb, el valor mínimo fue de 98 y el máximo de 145 pb. Todas las secuencias analizadas obtuvieron un porcentaje superior al 70% por lo cual pueden ser utilizadas para los siguientes análisis.

Tabla 20. Calidad de las secuencias QV.

	QV ≥ 20	% BASES confiable	Bases leídas
Promedio	128.63	89.67	143.1
mínimo	72	72.59	98
maximo	142	97.93	145

9.10. Alineamiento de secuencias con BLAST

Después de determinar la calidad de las secuencias se realizó un alineamiento BLAST para cada secuencia con la secuencia de referencia utilizada para el diseño de los oligonucleótidos, la NG_012022.1. En este análisis se determinó si el producto de amplificación corresponde a CEBP α , un ejemplo es lo que se puede observar en la figura 12 correspondieron a la secuencia CEBP α en un 100% ya que en este caso no existió ninguna variante genética.

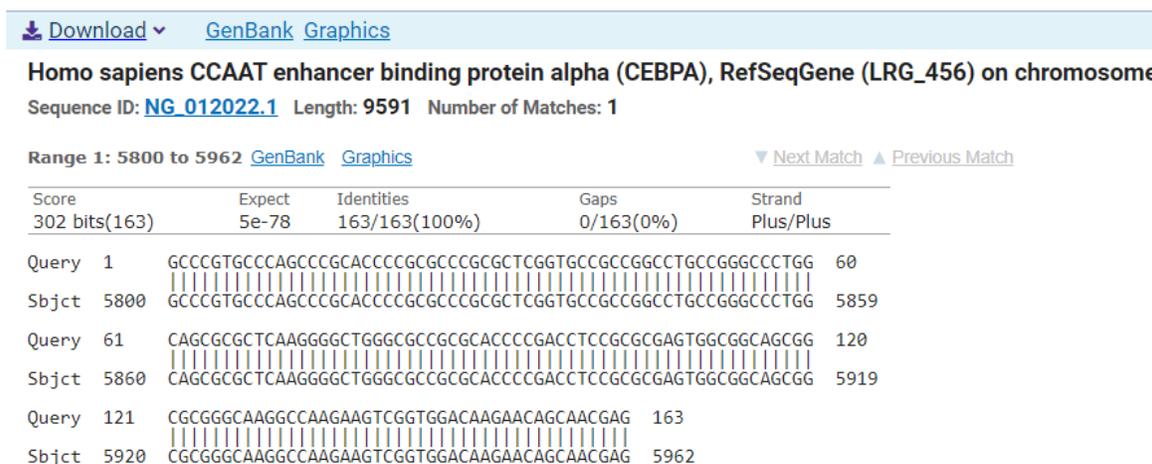


Figura 12. Ejemplo del alineamiento de una secuencia con la secuencia de referencia NG_012022.1

9.11 Alineamiento múltiple de las secuencias

Se realizó el alineamiento múltiple de las siguientes secuencias: B-UDMM-036, D-UDMM-004, D-UDMM-010, D-UDMM-024, E-UDMM-029, D-UDMM-037, E-UDMM-056, E-UDMM-057, E-UDMM-060, D-UDMM-061, D-UDMM-064, D-UDMM-066, D-UDMM-069, D-UDMM-072, D-UDMM-075, D-UDMM-78, D-UDMM-088, D-UDMM-105, D-UDMM-111, D-UDMM-122, D-UDMM-133, D-UDMM-142, E-UDMM-107, E-UDMM-121, E-UDMM-132, E-UDMM-136, E-UDMM-146, E-UDMM-147, E-UDMM-152, E-UDMM-161, E-UDMM-162 con la secuencia de referencia del GenBank NG_012022.1 y se ubicó el sitio de unión al ADN.

De las 31 secuencias, 22 secuencias tuvieron al menos un cambio en un nucleótido. En las figuras del anexo IV y V se encuentran los SNPs encontrados por voluntario con su IMC.

9.11.1 Sitio de unión al ADN

En la figura 13 se muestra el alineamiento múltiple en el sitio de unión al ADN; se pueden observar 14 variantes, en la figura se puede observar recuadros blancos con un cambio de una letra esto nos indica que hay una variante en ese sitio, y se puede observar que hay una densidad alta de variantes de la posición 57 a la 72, se encuentran 10 de los 14 SNPs.



Figura 13. Alineamiento múltiple del sitio de unión al ADN de 31 muestras por medio del software CLC viewer 2

De las 14 variantes encontradas 5 ya han sido reportadas en el GenBank (tabla 21) pero no han sido asociadas con alguna patología, es importante mencionar que las variantes reportadas no se han encontrado en el 1% de la población por lo cual no se consideran SNPs sino mutaciones. Se encontraron variantes que tienen alta frecuencia como es la variante en la posición 6865 en donde hay un doble polimorfismo ya que se cambia una C por una A y una C por una T y se encuentran en una frecuencia de 19.35 y 3.22% respectivamente. La variante genética reportada que encontramos con mayor frecuencia fue el reportado como Rs1275917470, en donde la variante reportada es el cambio de una G

por una C (6.45%), pero en nuestra población de estudio también se encontró el cambio de una G por una A, (12.9%). Un caso importante es el de la variante en la posición 5863 que ya ha sido reportada como Rs1364096520, que se encontró en el 12.9% de nuestra población analizada siendo una variante homocigota en el cambio de una C por una G.

Tabla 21. SNPs encontrados en el sitio de unión al ADN, del gen CEBPa

SNP	Posición cromosoma	Posición en el gen	Cambio de nucleótido	Frecuencia %	Reportado
1	19:33,301,725	5810	A por C (M)	6.45	No
2	19:33,301,690	5835	G por T (K)	3.22	No
3	19:33,301,687	5838	C por T (Y)	3.22	No
4	19:33,301,679	5846	C por T (Y)	3.22	No
5	19:33,301,669	5856	C por A (M)	9.67	RS1446673156 Cambio por T
6	19:33,301,668	5857	T por G	6.45	No
7	19:33,301,667	5858	G por A (R)	3.22	RS1555742056
8	19:33,301,663	5862	G por C (S)	9.67	No
9	19:33,301,662	5863	G por C	12.9	RS1364096520
10	19:33,301,660	5865	C por T (Y), C por A (M)	3.22 19.35	No
11	19:33,301,658	5867	C por A (M) C por G	12.9 6.45	RS1275917470
12	19:33,301,657	5868	T por G (K)	3.22	No
13	19:33,301,655	5870	G por A	3.22	RS771005232
14	19:33,301,654	5871	A por G (R) A por G	6.45 6.45	No

En verde están marcados los SNP reportados.

9.11.2. Resto de la secuencia

En la figura 14 se muestra el alineamiento múltiple de la secuencia en donde se encontraron 17 variantes a lo largo de la secuencia. Hay una densidad mayor de variantes de la posición 103 a la 110.

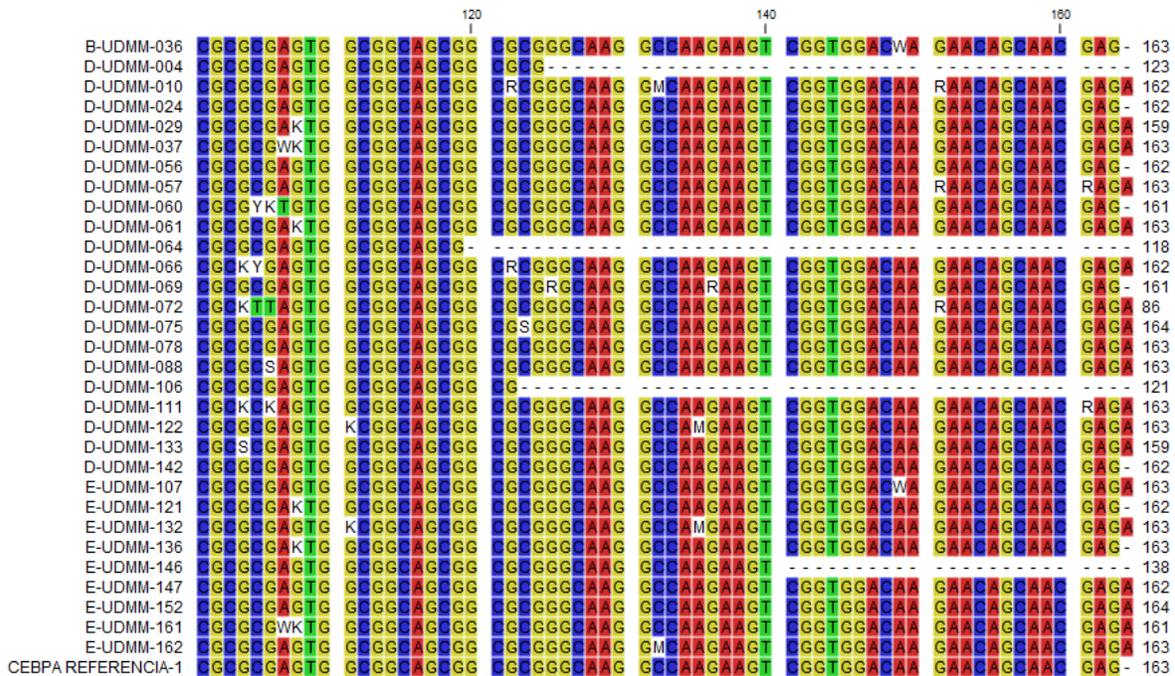


Figura 14. Alineamiento múltiple del resto de la secuencia de 31 muestras analizadas en el software CLC Viewer 2

De las 17 variantes encontradas 7 ya han sido reportadas en el GenBank (tabla 22), al igual que las encontradas en el sitio de unión al ADN no han sido asociadas a patologías y su frecuencia es menor al 1% por lo cual se les considera mutaciones. Se encontró una variante nueva que está presente en el 19.35% en la posición 5907 en donde se cambia una G por una T.

Se encontraron variantes que tienen alta frecuencia como es la variante en la posición 6865 en donde hay un doble polimorfismo ya que se cambia una C por una A y una C por una T y se encuentran en una frecuencia de 19.35 y 3.22% respectivamente. La variante genética reportada que encontramos con mayor frecuencia fue el reportado como Rs1275917470, en donde la variante reportada es el cambio de una G por una C (6.45%), pero en nuestra población de estudio también se encontró el cambio de una G por una A, (12.9%). Un caso importante es el de la variante en la posición 5863 que ya ha sido reportada como Rs1364096520 y se encontró en el 12.9% de nuestra población analizada, siendo una variante homocigota en el cambio de una C por una G. Se encontró una variante con el 9.67% que ya había sido reportada en la posición 5904 con el RS755401672, pero se

encontró que ocurría un cambio de una C por una G, y en la población estudiada se encontró el cambio de una G por una T.

Tabla 22. SNPs encontrados en el resto de la secuencia del gen CEBP α

SNP	Posición cromosoma	Posición en el gen	Cambio de nucleótido	Frecuencia	Reportado
15	19:33,301,644	5881	C por G	3.22	No
16	19:33,301,643	5882	G por C (S)	3.22	No
17	19:33,301,622	5903	G por C (S) G por T (K)	3.22 9.67	No
18	19:33,301,621	5904	C por T (Y) C por T	9.67	RS755401672 Por G
19	19:33,301,620	5905	G por T (K) G por C (S)	3.22 9.67	No
20	19:33,301,619	5906	A por T (W) A por T	9.67	No
21	19:33,301,618	5907	G por T (K)	19.35	No
22	19:33,301,615	5910	G por A (K)	6.45	No
23	19:33,301,604	5921	G por A (R)	6.45	RS756632245
24	19:33,301,603	5922	C por T (S)	3.22	RS1403352822
25	19:33,301,601	5924	G por A (R)	3.22	RS1363412918
26	19:33,301,594	5931	C por A (M)	6.45	RS767673311
27	19:33,301,591	5934	G por A (M)	6.45	RS757273086
28	19:33,301,590	5935	G por A (R)	3.22	No
29	19:33,301,577	5948	A por T (W)	6.45	No
30	19:33,301,575	5950	G por A (R)	9.67	No
31	19:33,301,565	5960	G por A (R)	6.45	RS1002344182

En verde están marcados los SNPs reportados anteriormente

9.12 Predictor de daño a la estructura y función de la proteína

Debido a que se secuenció una región codificante que incluye el sitio de unión al ADN del gen CEBP α , un cambio en la secuencia de aminoácidos puede ser perjudicial para su función debido a que el cambio de dichos aminoácidos puede originar un plegado

diferente de la proteína y por lo mismo puede ocasionar que no realicen homodímeros o heterodímeros con otras proteínas y no pueda unirse correctamente al ADN blanco y llevar a cabo su función.

9.12.1. Sitio de unión al ADN

Para determinar si el cambio de nucleótido afectaba la proteína de CEBP α se hizo la traducción de nucleótido a proteína de las 22 secuencias en que se tuvo una variante genética. En el sitio de unión al ADN se encontraron 14 SNPs y de estos el 14.28% fueron sinónimos, es decir que no hay un cambio en la secuencia de aminoácidos y correspondieron a los SNPs A5857G y G5862C. Se llevó a cabo una predicción del daño con ayuda del Software *PolyPhen-2*⁹¹, y como se puede observar en la tabla 23, el 35.71% de los cambios puede producir un cambio dañino a la proteína, en la variante C5838T se produce un cambio de una leucina que es un aminoácido alifático por una fenilalanina que es un aminoácido aromático; en la variante G5858A se produce un cambio de una glicina que es un aminoácido alifático y por una serina que es un aminoácido polar sin carga; en la variante T5868G se produce un cambio de una leucina que es un aminoácido alifático por una arginina, que es un aminoácido cargado positivamente, en la variante G5870A cambia una glicina que es un aminoácido alifático por una lisina que tiene una carga positiva, en la variante A5871G cambia una lisina que tiene carga positiva por una arginina que es un aminoácido cargado positivamente. El 50% de los SNPs son benignos, es decir que el cambio en la estructura de la proteína no causa un daño, debido a que es similar a la proteína nativa.

Tan solo se identificó que el SNP A5871G es dañino y se expresa con una frecuencia de 16.12% en los voluntarios B-UDMM-036 y E-UDMM-121 que tienen obesidad.

Tabla 23. Predicción de daño de la proteína de los SNPs encontrados en el sitio de unión al ADN

	SNP	Cambio de aminoácido	Cambio en la proteína	Homocigoto/Heterocigoto
1	A 5810C	S por R	Posible benigno	Heterocigoto
2	G5835T	G por V	Posible benigno	Heterocigoto
3	C5838T	A por V	Posible benigno	Heterocigoto
4	C 5846T	L por F	Posible dañino	Heterocigoto
5	C5856A	P por H	Posible benigno	Heterocigoto
6	T 5857G	P por P	Sinónimo	Heterocigoto
7	G5858A	G por S	Posible dañino	Heterocigoto
8	G5862C	S por S	Sinónimo	Heterocigoto
9	G5863C	S por R	Posible benigno	Homocigoto
10	C5865T C5865A	A por Q	Posible benigno	Heterocigoto
11	C5867A	L por I	Posible benigno	Heterocigoto
12	T5868G	L por R	Posible dañino	Heterocigoto
13	G5870A	G por K	Posible dañino	Homocigoto
14	A5871G	K por R	Posible dañino	Heterocigoto

9.12.2. Resto de la secuencia

En cuanto a la predicción del daño en la proteína en el resto de la secuencia que se analizó (tabla 24), de los 17 SNPs encontrados en esta región el 23.52% son sinónimos, la variante C5881G, G5905T, G5935A, G5950T. El software PolyPhen-2 indicó que el 23.52% de las variantes pueden provocar daño, (G5910D, G5924A, G5948T, G5960A) La variante G5910D cambia una glicina que es un aminoácido alifático por un aspartato que es un aminoácido cargado negativamente; el G5924A cambia una glicina que es un aminoácido alifático por una serina que es un aminoácido polar sin carga; el G5948T cambia una lisina que es un aminoácido cargado positivamente por un codón de paro, es decir que la proteína quedará trunca y no será del tamaño correcto; la variante G5960A cambia un glutamato que es un aminoácido con carga negativa por una lisina que es un aminoácido cargado positivamente. El 52.94% de los SNPs son benignos, es decir que el cambio no será drástico y ocasiona un cambio menor en la proteína y en la función.

Algo interesante es la variante G5948T que ocasiona un paro en la proteína, esta sólo se encontró en dos voluntarios con obesidad.

Tabla 24. Predicción de daño de la proteína de los SNPs encontrados en el resto de la secuencia

	SNP	Cambio de aminoácido	Cambio en la proteína	Homocigoto/Heterocigoto
15	C5881G	G por G	Sinónimo	Homocigoto
16	G5882C	A por P	Posible benigno	Heterocigoto
17	G5903C	A por L	Posible benigno	Heterocigoto
	G5903T	A por F		Heterocigoto
18	C5904T	A por V	Posible benigno	Heterocigoto
19	G5905T	A por A	Sinónimo	Heterocigoto
20	A5906T	S por C	Posible benigno	Heterocigoto
21	G5907T	S por I	Posible benigno	Heterocigoto
22	G5910A	G por D	Posible dañino	Heterocigoto
23	G5921A	A por T	Posible benigno	Heterocigoto
24	C5922T	A por V	Posible benigno	Heterocigoto
25	G5924A	G por S	Posible dañino	Heterocigoto
26	C5931A	A por D	Posible benigno	Heterocigoto
27	G5934A	K por R	Posible benigno	Heterocigoto
28	G5935A	K por K	Sinónimo	Heterocigoto
29	A5948T	K por STOP	Posible dañino	Heterocigoto
30	G5950T	K por k	Sinónimo	Heterocigoto
31	G5960A	E por K	Posible dañino	Heterocigoto

10. DISCUSIÓN

Población de estudio y prevalencia de sobrepeso y obesidad. Comparación con datos de la ENSANUT 2018-19

El objetivo principal de este estudio fue identificar nuevos SNPs en el dominio de unión al ADN que codifica para el factor transcripcional CEBP α . Se utilizaron muestras de un biobanco recolectado del 2008 al 2018 de voluntarios que se identificaban a sí mismos como sanos. De los 31 voluntarios en que se analizó el sitio de unión al ADN de CEBP α , 74.2% tuvieron sobrepeso y 25.8% obesidad. Si bien este estudio no incluyó voluntarios con IMC normal, el porcentaje de personas con IMC elevado identificado en el total de incluidos en las bases de datos mostró una prevalencia de sobrepeso y obesidad mayor al reporte mostrado en la ENSANUT 2018-19, que fue de 39.1% para sobrepeso y 36.1% para obesidad,¹³ (datos no mostrados).

Se ha reportado que la población mexicana consume alimentos no recomendables, el 85.8% consume bebidas no lácteas endulzadas, también se consumen alimentos como cereales y botanas dulces con un 33.9% y 35.4% respectivamente¹³. Si bien este factor ha hecho que aumente considerablemente la prevalencia de sobrepeso y obesidad en México, es necesaria la evaluación de factores genéticos que participan en la ocurrencia de este problema de salud.

Genes en la evolución de la obesidad

Se ha postulado la presencia de “genes ahorradores” en el desarrollo de obesidad, estimulados desde hace millones de años, en que antepasados primates no tenían seguridad alimentaria. Estos genes ocasionaban que se depositara grasa de forma eficiente para ayudar con la época de hambruna por lo cual era ventajoso para nuestros antepasados debido a que tenían reservas energéticas para sobrevivir.⁹⁹ En la actualidad estos “genes ahorradores” se han constituido en una desventaja debido a que ya tenemos a nuestra disposición una gran cantidad de alimentos y la deposición de grasa ocasionada que esos genes da como resultado obesidad y diabetes.¹⁰⁰ Existen diferentes “genes ahorradores” entre ellos el gen de la leptina y PPAR γ ;¹⁰¹ ambos casos se han encontrado SNPs que ocasionan obesidad en individuos.

Importancia de los SNPs

La importancia de los SNPs radica en su posibilidad de representar riesgos para desarrollar enfermedades. En nuestro grupo de investigación se ha trabajado con genes que intervienen en el metabolismo de los lípidos como son PPAR γ , FOXO1 y en este estudio CEBP α . En ellos se ha encontrado una gran cantidad de variantes de un solo nucleótido en población con condiciones como obesidad, colesterol y triglicéridos elevados, y resistencia a la insulina.

Variabilidad del sitio de unión al ADN.

El presente estudio tuvo como finalidad buscar nuevos polimorfismos de un solo nucleótido en el dominio de unión al ADN de CEBP α . Se encontraron 14 variantes en esta región de los cuales nueve no han sido reportadas en el GenBank¹⁰² Las reportadas no se han asociado a ninguna patología debido a que no hay estudios previos de asociación en este sitio de la proteína. Se observó que hay una región que tiene una alta densidad de variantes que va de la posición 5854 a la 5871, en donde se encuentran 10 de las 14 variantes encontradas. Hay variantes que tienen altas frecuencias como la C6865A que estuvo presente en el 19.35%. Se encontró un SNP que ya había sido reportado (Rs1364096520), con una frecuencia del 12.9% de nuestra población siendo en todos los casos un SNP heterocigoto, además es un cambio que produce una proteína con una secuencia diferente, pero según el programa Polyphen-2 se produce un cambio en la proteína que es benigno, es decir que el cambio de la proteína no es drástico ya que los aminoácidos que cambian pertenecen al mismo grupo.

Es de hacer notar que a pesar de que se obtuvieron polimorfismos ya reportados por el GenBank, la mayor frecuencia de polimorfismos se encontró en los reportados por nuestro grupo, esto nos da un indicio que nuestra población tiene un fondo genético diferente al europeo que es donde se ha estudiado ese gen. También es importante notar que en los estudios realizados por diferentes grupos de investigación en Europa se ha encontrado SNPs con frecuencias bajas, el que se ha encontrado con una frecuencia del 25,4% es el Rs34529039 asociado con cáncer de ovario en población polaca⁷⁵

Al relacionar las variantes encontradas con los datos antropométricos de los voluntarios (datos no mostrados) se encontró que un voluntario (D-UDMM-133), a pesar de no tener los niveles más altos de IMC, tuvo la mayor cantidad de SNPs (6), pero compartió 4 variantes con los voluntarios con los IMC más altos (T5857G, G5863C, C5865A y C5867G).

Otro dato importante es que hubo 5 variantes que se encontraron en pacientes con los IMC mayores (G5863C, C5865A, C5867A, A5871G y T5857G) y estos pueden ser posibles candidatos para ser analizados en búsqueda de una asociación para el desarrollo de IMC mayor.

En el análisis de predicción de daño y función de la proteína, se encontró que 14.28% de las variantes encontradas eran Sinónimos. Se ha observado en otros estudios en el que el cambio del codón puede ocasionar un cambio en los niveles de la proteína, esto se da debido a que hay ARN de transferencia más abundantes que otros, debido a que se tienen más repeticiones de estos en todo el genoma.⁷⁵

Otros SNPs encontrados en CEBPa

En este estudio se logró determinar otros SNPs que no se ubicaron en este sitio de unión al ADN de CEBP α , pero sí se localizaron en la región codificante del gen, lo cual también es de importancia, debido a que un cambio en un nucleótido puede ocasionar un cambio en la secuencia de aminoácidos y provocar una proteína mal plegada. Se encontraron 17 variantes en esta región, de las cuales 10 son nuevas y 7 ya han sido reportadas en el GenBank, siendo la variante G5907T la más frecuente (19.35%). Hay una variante en la posición 6865 en donde hay un doble polimorfismo ya que se cambia una C por una A y una C por una T y se encuentran en una frecuencia de 19.35 y 3.22%, respectivamente.

En esta región del CEBP α al analizar la predicción de daño en la proteína, se encontraron que el 23.52% de los SNPs son dañinos, y en especial el SNP G5948T que provoca un paro en la proteína, se encontró en los voluntarios con los IMC mayores (datos no mostrados). Es de destacar que en estos dos casos se trató un SNP heterocigoto, por lo tanto, se tiene un alelo que puede provocar la proteína del tamaño adecuado. Se ha

estudiado que CEBP α es muy importante para la homeostasis energética; Wang y colaboradores demostraron que la proteína CEBP α es fundamental para el establecimiento y mantenimiento de la homeostasis energética, en un estudio con ratones mutantes homocigotos que carecían de la expresión de la proteína de CEBP α , en los cuales los ratones después de 8 horas de nacidos morían por hipoglucemia debido a que no almacenaron glucógeno,¹⁰³ lo que muestra que cuando hay SNPs dañinos importantes como el G5948T y no hay un alelo WT se puede provocar un daño grave en el organismo, que no puede llevar a cabo ninguna de sus funciones.

Posibles candidatos para estudios de asociación

Se encontraron 31 SNPs en toda la secuencia analizada incluido el sitio de unión al ADN, de estos SNPs algunos fueron muy frecuentes y se muestran como candidatos para realizar estudios de asociación para obesidad. De ellos, el SNP A5871G es un SNP potencialmente dañino y fue el más frecuente (16.12%) y se encontró en dos de los voluntarios con el IMC más alto. Otro posible candidato es el A5948T, que no se encuentra en el sitio de unión al ADN, pero es un SNP que provoca una señal de paro, además de que se encontró en los voluntarios con el mayor número de índice de masa corporal. Sería de mucha importancia poder conocer la asociación que tienen estos dos SNPs con sobrepeso y obesidad y así poder determinar el impacto para su constitución como biomarcador o el poder interpretar su participación en la fisiología en los procesos metabólicos involucrados.

11. FORTALEZAS Y LIMITACIONES

Este estudio permitió establecer un diseño para la amplificación y secuenciación de estos genes ricos en GCs; su principal limitación consiste en la cantidad de muestra de ADN incluidas, aspecto que se vio condicionado por limitantes de tipo operativo que no fueron atribuidas a una decisión del grupo de investigación. Además de ello, el gen CEBP α es rico en GCs por lo cual es más complicado amplificarlo y secuenciarlo, y se requieren insumos más costosos para llevarse a cabo.

Si bien es necesario considerar que las muestras analizadas han sido almacenadas durante mucho tiempo, lo que podría afectar su calidad, todos los procedimientos de laboratorio realizados se encuentran protocolizados y estandarizados y los resultados obtenidos de estos cumplen con criterios de calidad esperados.

También, es necesario señalar que la identificación inicial de SNPs permitirá determinar la posible asociación de dichas variantes con diversas patologías.

12. CONCLUSIONES

Fue posible identificar 14 SNPs en el sitio de unión al ADN del factor de transcripción CEBP α , de los cuales 9 de ellos no han sido reportados previamente, con frecuencias del 3.22% al 19.35%.

Se identificaron 17 SNPs en el resto de la secuencia que no correspondía al sitio de unión al ADN, de los cuales 10 no han sido reportadas previamente, con una frecuencia que va de 3.22% al 19.35%

13. PERSPECTIVAS

Realizar un estudio de asociación entre los nuevos SNPs detectados que tuvieron una alta frecuencia en individuos con obesidad y sobrepeso

Realizar la identificación de variantes alélicas en los dos sitios de transactivación del gen CEBP α en población con obesidad y sobrepeso.

14. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Kinlen D, Cody D, O'Shea D. Complications of obesity. *An Int J Med*. 2018;111(7):437-43. doi:10.1093/qjmed/hcx152.
2. Bischoff SC, Boirie Y, Cederholm T, Chourdakis M, Cuerda C, Delzenne NM, et al. Towards a multidisciplinary approach to understand and manage obesity and related diseases. *Clin Nutr* 2017; 36(4):917-38. doi: 10.1016/j.clnu.2016.11.007
3. Adamski J. Genome-wide association studies with metabolomics. *Genome Med* 2012; 4 (34):1-7. doi:10.1186/gm333
4. Qiao L, Shao J. SIRT1 Regulates Adiponectin Gene Expression through Foxo1-C / Enhancer-binding Protein α Transcriptional Complex. *J Biol Chem* 2006;281(52):39915-24. doi:10.1074/jbc.M607215200.
5. Hollenberg A, Susulic VS, Madura JP, Zhang B, Moller DE, Tontonoz P, et al. Functional Antagonism between CCAAT / Enhancer Binding on the Leptin Promoter. *J Biol Chem* 1997;272(8):5283-90. doi:10.1074 / jbc.272.8.5283
6. Ren W, Guo J, Jiang F, Lu J, Ding Y, Li A, et al. CCAAT / Enhancer-Binding Protein? Is a Crucial Regulator of Human Fat Mass and Obesity Associated Gene Transcription and Expression. *Biomed Res Int* 2014:1-7. doi:10.1155/2014/406909.
7. Kempler F, Breban D, Oberkofler H, Esterbauer H, Hell E, Paulweber B, et al. Leptin, Peroxisome Proliferator-Activated Receptor- γ , and CCAAT/Enhancer Binding Protein- α mRNA Expression in Adipose Tissue of Humans and Their Relation to Cardiovascular Risk Factors. *Arterioscl Throm Vas* 2000;20(2):443-9
8. Organización Mundial de la Salud. Sobrepeso y obesidad. [homepage en Internet] OMS; 2019 [actualizada marzo 2019; consultado junio 2020] Disponible en: <https://www.who.int/es/news-room/fact-sheets/detail/obesity-and-overweight> 2016.
9. Norma oficial mexicana Para el tratamiento integral del sobrepeso y la obesidad. NOM-008-SSA3-2017. *Diario Oficial de la Federación*, (18-05-2018).
10. Organización Mundial de la Salud. Prevalence of obesity among adults, BMI \geq 30, crude estimates by WHO region. [homepage en Internet] OMS; c2019 [actualizada 22 de septiembre de 2017; consultado junio 2020] Disponible en: <http://apps.who.int/gho/data/view.main.BMI25CREGv?lang=en> 2017

11. Segula D. Complications of obesity in adults: A short review of the literature. *Malawi Med J.* 2014;26(1):20-4
12. Klop B, Elte JW, Cabezas MC. Dyslipidemia in Obesity: Mechanisms and Potential Targets. *Nutrients* 2013;5(4):1218-40. doi: 10.3390/nu5041218
13. Shamah-Levy T, Vielma-Orozco E, Heredia-Hernández O, Romero-Martínez M, Mojica-Cuevas J, Cuevas-Nasu L, Santaella-Castell JA, Rivera-Dommarco J. Encuesta Nacional de Salud y Nutrición 2018-19: Resultados Nacionales. Cuernavaca, México: Instituto Nacional de Salud Pública, 2020.
14. Secretaria de Salud. Instituto Nacional de Salud Pública. Encuesta Nacional de Salud y Nutrición 2012. Resultados por entidad federativa, Morelos. [homepage en Internet] INSP; 2012. Disponible en: <https://ensanut.insp.mx/informes/Morelos-OCT.pdf> 2012.
15. Redinger RN. The Pathophysiology of Obesity and Its Clinical Manifestations. *Gastroenterol Hepatol* 2007;3(11):856–63.
16. Clément K, Fereé P. The Genetics of Childhood Disease and Development: A Series of Review Articles Genetics and the Pathophysiology of Obesity. *Pediatr Res* 2003;53(5):721-5. Doi: 10.1203/01.PDR.0000059753.61905.58
17. Suarez-Carmona W, Sánchez-Oliver AJ, González-Jurado JA. Pathophysiology of obesity: Current view. *Rev chil nutr* 2017; 44(3):226-33. Doi:10.4067/s0717-75182017000300226
18. Al-suhaimi E, Shehzad A. Leptin, resistin and visfatin: The missing link between endocrine metabolic disorders and immunity. *Eur J Med Res* 2013; 18(12):1-13. Doi: 10.1186 / 2047-783X-18-12
19. Hansongyi L, En Seok L, Ryowon C. Obesity, Inflammation and Diet. *Pediatr Gastroenterol Hepatol Nutr* 2013;16(3):143-52. doi:10.5223 / pghn.2013.16.3.143
20. Münzberg H, Morrison CD. Structure, production and signaling of leptin. *Metabolism* 2016;64(1):13-23. doi: 10.1016/j.metabol.2014.09.010.
21. Sáinz N, Barrenetxe J, Moreno-Aliaga MJ, Martínez JA. Leptin resistance and diet-induced obesity: central and peripheral actions of leptin. *Metabolism* 2015;64(1):35-46. doi: 10.1016/j.metabol.2014.10.015.
22. De Git KCG, Peterse C, Beerens S, Luijendijk MCM, Van Der Plasse G, La Fleur SA, et al. Is leptin resistance the cause or the consequence of diet-induced obesity? *Int J Obes* 2018;42(8):1445-57. doi:10.1038 / s41366-018-0111-4

23. Crujeiras A, Carreira MC, Cabia B, Andrade S, Amil M, Casanueva FF. Leptin resistance in obesity: An epigenetic landscape. *Life Sci* 2015; 140:57-63. doi: 10.1016/j.lfs.2015.05.003.
24. Wagoner B, Hausman DB, Harris RB. Direct and indirect effects of leptin on preadipocyte proliferation and differentiation. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 2006;290(6):1557-64. doi:10.1152/ajpregu.00860.2005.
25. Hong W, Park J, Yun W, Kang PJ, Son D, Jang J, et al. Inhibitory effect of celastrol on adipogenic differentiation of human adipose-derived stem cells. *Biochem Biophys Res Commun* 2018;507(1-4):236-41. doi: 10.1016/j.bbrc.2018.11.014
26. Park KW, Halperin DS, Tontonoz P. Before they were fat: adipocyte progenitors. *Cell Metab* 2008;8(6):454-7. doi:10.1016/j.cmet.2008.11.001
27. Peirce V, Carobbio S, Vidal A. The different shades of fat. *Nature* 2014; 510:76-83. doi:10.1038/nature13477
28. Park A, Kim WK, Bae KH. Distinction of white, beige and brown adipocytes derived from mesenchymal stem cells. *World J Stem Cell* 2014;6(1):33-42. doi:10.4252/wjsc.v6.i1.33
29. Van De Berg SM, Van Dam AD, Rensen PC, De Winther MP, Lutgens E. Immune Modulation of Brown(ing) Adipose Tissue in Obesity. *Endocr Rev* 2017;38(1):46-68. doi:10.1210/er.2016-1066.
30. Wang W, Seale P. Control of brown and beige fat development. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2017;17(11):691-702. doi: 10.1038/nrm.2016.96.Control
31. Tariq AAT, Hochfeld WE, Myburgh R, Pepper MS. Adipocyte and adipogenesis. *Eur J Cell Biol* 2013;92(6-7):229-36. doi:10.1016/j.ejcb.2013.06.001
32. Drolet R, Richard C, Sniderman AD, Mailloux J, Fortier M, Hout C et al. Hypertrophy and hyperplasia of abdominal adipose tissues in women. *Int J Obes* 2008;32(2): 283-91. doi: 10.1038 / sj.ijo.0803708
33. Tang Q, Lane MD. Adipogenesis: From Stem Cell to Adipocyte. *Annu Rev Biochem* 2012; 81:715-36. doi: 10.1146 / annurev-biochem-052110-115718
34. Feve B. Adipogenesis: cellular and molecular aspects. *Best Pract Res Clin Endocrinol Metab* 2005;19(4):483-99. doi: 10.1016/j.beem.2005.07.007.

35. Pellegrinelli V, Carobbio S, Vidal A. Adipose tissue plasticity: how fat depots respond differently to pathophysiological cues. *Diabetologia* 2016;59(6):1075-88. doi:10.1007/s00125-016-3933-4.
36. Cao Y. Angiogenesis and Vascular Functions in Modulation of Obesity, adipose metabolism, and insulin sensitivity. *Cell Metab* 2013;18(4):478-89. doi:10.1016/j.cmet.2013.08.008
37. Choe S, Huh Y, Hwang J, Kim JI, Kim JB. Adipose Tissue Remodeling: its Role in energy Metabolism and Metabolic Disorders. *Front Endocrinol (Lausanne)* 2016; 7:1-16. doi:10.3389/fendo.2016.00030
38. Gavrilova O, Marcus B, Graham D, Kim JK, Shulman GI, Castle AL, et al. Surgical implantation of adipose tissue reverses diabetes in lipoatrophic mice. *J Clin Invest* 2000;105(3):271-8. doi:10.1172 / JCI7901
39. Jang H, Kim M, Lee S, Kim J, Woo DC, Kim KW, et al. Adipose tissue hyperplasia with enhanced adipocyte-derived stem cell activity in Tc1 (C8orf4) deleted mice. *Nat Publ Gr* 2016; 6:1-10. doi:10.1038/srep35884
40. Hruby A, Hu FB. The Epidemiology of Obesity: A Big Picture. *Pharmacoeconomics* 2016; 33(7):673-89. doi:10.1007/s40273-014-0243-x.
41. Khan MJ, Gerasimidis K, Edwards CA, Shaikh MG. Mechanisms of obesity in Prader – Willi syndrome. *Pediatr Obes* 2016; 13(1):3-13. doi:10.1111/ijpo.12177.
42. Perusse L, Rankinen T, Zuberi A, Chagnon YC, Weisnagel SJ, Argyropoulos G, et al. The Human Obesity Gene Map: The 2004 update. *Obes Res* 2005;13(3):381-90. doi:10.1038/oby.2005.50
43. Yamauchi T, Kamon J, Waki H, Tarauchi Y, Kubota N, Hara K et al. The fat-derived hormone adiponectin reverses insulin resistance associated with both lipoatrophy and obesity. *Nat Med* 2001; 7(8):941-6. doi: 10.1038 / 90984
44. Tu Y, Yu Q, Fan G, Yang P, Lai Q, Yang F, et al. Assessment of type 2 diabetes risk conferred by SNPs rs2241766 and rs1501299 in the ADIPOQ gene, a case/control study combined with meta-analyses. *Mol Cell Endocrinol* 2014; 396(1-2):1-9. doi: 10.1016/j.mce.2014.08.006

45. Tontonoz P, Hu E, Spiegelman BM. Stimulation of Adipogenesis by PPAR γ 2, a Lipid-Activated in Fibroblasts Transcription Factor. *Cell* 1994; 79(7):1147-56. doi:10.1016/0092-8674(94)90006-X.
46. Luan J, Browne PO, Harding AH, Halsall DJ, O'Rahilly S, Chatterjee VK, et al. Evidence for Gene-Nutrient Interaction at the PPAR γ Locus. *Diabetes* 2001; 50(3):686-9. doi:10.2337/diabetes.50.3.686.
47. Matsuoka N, Patki A, Tiwari HK, Allison DB, Johnson SB, Gregersen PK, et al. Association of K121Q polymorphism in ENPP1 (PC-1) with BMI in Caucasian and African-American adults. *Int J Obes* 2006; 30(2):233-7. doi: 10.1038/sj.ijo.0803132
48. Ramírez J, Jiménez M. Functional implications of single nucleotide polymorphisms (SNPs) in protein-coding and non-coding RNA genes in multifactorial diseases. *Gac Med Mex.* 2017; 153:218-29.
49. Checa MA. Polimorfismos genéticos: Importancia y aplicaciones. *Rev Inst Nac enfermedades Respir* 2007; 20(3):213-21.
50. Berulava T, Horsthemke B. The obesity-associated SNPs in intron 1 of the FTO gene affect primary transcript levels. *Eur J Hum Genet* 2010;18(9):1054-6. doi:10.1038/ejhg.2010.71.
51. García P, Reyes M, Flores K, García OP, Rosaldo JL, Méndez L, et al. Fat mass obesity-associated (FTO) (rs9939609) and melanocortin 4 receptor (MC4R) (rs17782313) SNP are positively associated with obesity and blood pressure in Mexican school-aged children. *Br J Nutr* 2016; 116(10):1834-40. doi:10.1017/S0007114516003779
52. González-Herrera L, Zavala-Castro J, Ayala-Cáceres C, Pérez-Mendoza G., López-González MJ, et al. Genetic variation of FTO: rs1421085 T>C, rs8057044 G>A, rs9939609 T>A, and copy number (CNV) in Mexican Mayan school-aged children with obesity/overweight and with normal weight. *Am J Hum Biol.* 2019;31(1):1-13. doi:10.1002/ajhb.23192
53. Villarreal-Molina MT, Aguilar-Salinas CA, Rodríguez-Cruz M, Riaño D, Villalobos-Comparan M, Coral-Vázquez R, et al. The ATP-Binding Cassette Transporter A1 R230C Variant Affects HDL Cholesterol Levels and BMI in the Mexican Population. *Am Diabetes Assoc* 2007; 56(7):1881-7. doi:10.2337/db06-0905
54. Arellano O, Flores T, Kruit JK, Villareal T, Acuña V, Hünemeier T, et al. A functional ABCA1 gene variant is associated with low HDL-cholesterol levels and shows evidence of

- positive selection in Native Americans. *Hum Mol Genet* 2010; 19(14):2877-85. doi:10.1093/hmg/ddq173
55. Ramji DP, Foka P. CCAAT / enhancer-binding proteins: structure, function and regulation. *Biochem J* 2002;365(3):561-75. doi: 10.1042 / BJ20020508
 56. Vohl MC, Sladek R, Robitaille J, Gurd S, Marceau P, Richard D, et al. A survey of genes differentially expressed in subcutaneous and visceral adipose tissue in men. *Obes Res* 2004; 12(8):1217-22. Doi: 10.1038/oby.2004.153
 57. Matsusue K, Gavrilova O, Lambert G, Brewer HB, Ward JM, Inoue Y, et al. Hepatic CCAAT / Enhancer Binding Protein α Mediates Induction of Lipogenesis and Regulation of Glucose Homeostasis in Leptin-Deficient Mice. *Mol Endocrinol* 2004;18(11):2751-64. doi:10.1210/me.2004-0213
 58. Homo sapiens CCAAT enhancer binding protein alpha (CEBPA), RefSeqGene (LRG_456) on chromosome 19. [Base de datos en Internet]. NCBI: National Center for Biotechnology Information (US);2019- [acceso junio 2021] Disponible en: https://www.ncbi.nlm.nih.gov/nucore/NG_012022.1
 59. Leroy H, Roumier C, Huygheet P, Biggio V, Fenaux P, Preudhomme C. Review CEBPA point mutations in hematological malignancies. *Nature*. 2005:329-34. doi: 10.1038/sj.leu.2403614. doi: 10.1038/sj.leu.2403614.
 60. Delgado J, Pérez P, García A, Phillips CM, Hall W, Gjelstad IM, et al. A gene variation (rs12691) in the CCAT / enhancer binding protein A modulates glucose metabolism in metabolic syndrome. *Nutr Metab Cardiovasc Dis* 2013;23(5):417-23. doi: 10.1016 / j.numecd.2011.09.008.
 61. Rosen E, Hsu C, Wang X, Sakai S, Freeman MW, Gonzalez FJ, et al. C/EBP α induces adipogenesis through PPAR γ : a unified pathway. *Genes Dev* 2002; 16:22-6. doi: 10.1101/gad.948702.nuclear
 62. Hollenberg A, Susulic VS, Madura JP, Zhang B, Moller DE, Tontonoz P, et al. Functional Antagonism between CCAAT / Enhancer Binding on the Leptin Promoter. *J Biol Chem* 1997;272(8):5283-90. doi:10.1074 / jbc.272.8.5283
 63. Wada N, Hirako S, Takenoya F, Kageyama H, Okabe M, Shioda S. Leptin and its receptors. *J Chem Neuroanat* 2014;61-62:191-99. doi: 10.1016/j.jchemneu.2014.09.002.

64. Malmstriim R, Taskinen MR, Karonen SL, Yki-Järvinen H. Insulin increases plasma leptin concentrations in normal subjects and patients with NIDDM. *Diabetologia* 1996;39(8):993-6. doi: 10.1007 / BF00403921
65. Pan H, Guo J, Su Z. Advances in understanding the interrelations between leptin resistance and obesity. *Physiol Behav* 2014; 130:157-69. doi: 10.1016/j.physbeh.2014.04.003.
66. Harris RBS. Biochimica et Biophysica Acta Direct and indirect effects of leptin on adipocyte metabolism. *Biochim Biophys Acta* 2014;1842(3):414-23. doi: 10.1016/j.bbadis.2013.05.009.
67. González E, Aguilar MJ, García CJ, García PA, Alvarez J, Padilla CA. Leptina: un péptido con potencial terapéutico en sujetos obesos. *Endocrinol y Nutr* 2010;57(7):322-7. doi: 10.1016/j.endonu.2010.03.018.
68. Terrasi M, Bazan V, Caruso S, Insalaco L, Amodeo V, Fanale D, et al. Effects of PPAR γ Agonists on the Expression of Leptin and Vascular Endothelial Growth Factor in Breast Cancer Cells. *J Cell Physiol* 2013;228(6):1368-74. doi:10.1002/jcp.24295
69. Osada S, Yamamoto H, Nishihara T, Imagawa M. DNA Binding Specificity of the CCAAT / Enhancer-binding Protein Transcription Factor Family. *J Biol Chem* 1996;271(7):3891-6.
70. Kadowaki T, Yamauchi T, Kubota N, Hara K, Ueki K, Tobe K. Adiponectin and adiponectin receptors in insulin resistance, diabetes, and the metabolic syndrome. *J Clin Invest* 2006;116(7):1784-92. doi:10.1172/JCI29126.1784.
71. Ziemke F, Mantzoros C. Adiponectin in insulin resistance: lessons from translational research. *Am Soc Nutr* 2010;91(1):258-61. doi:10.3945/ajcn.2009.28449C.258S.
72. Cnop M, Havel PJ, Utzschneider KM, Carr DB, Sinha MK, Boyko EJ, et al. Relationship of adiponectin to body fat distribution, insulin sensitivity and plasma lipoproteins: evidence for independent roles of age and sex. *Diabetologia* 2003;46(4):459-69. doi:10.1007/s00125-003-1074-z.
73. Nishizawa H, Shimomura I, Kishida K, Maeda N, Kuriyama H, Nagaretani H et al. Androgens Decrease Plasma Adiponectin, an Insulin-Sensitizing Adipocyte-Derived Protein. *Diabetes* 2002;51(9):2734-41. doi: 10.2337 / diabetes.51.9.2734
74. Boughanem H, Cabrera-Mulero A, Millán-Gómez M, Garrido-Sánchez L, Cardona F, Tinahones FJ, et al. Transcriptional Analysis of FOXO1, C/EBP α and PPAR-2 Genes and

- Their Association with Obesity-Related Insulin Resistance. *Genes* 2019; 10(9): 1-14. doi:10.3390/genes10090706
75. Konopka B, Szafron LM, Kwiatkowska E, Podgorska A, Zolocinska A 5 autores et al. The significance of c.690G>T polymorphism (rs34529039) and expression of the CEBPA gene in ovarian cancer outcome. *Oncotarget*. 2016;7(41):67412-24. doi:10.18632/oncotarget.11822
76. Olofsson LE, Orho-Melender M, William-Olsson L, Sjöholm-K, Sjöström L, Groop L, et al. Adipose Tissue Regulates Genes in Lipid and Glucose Metabolism and a Genetic Variation in C/EBP α Is Associated with Serum Levels of Triglycerides. *J Clin Endocrinol Metab* 2008;93(12):4880-6. doi:10.1210/jc.2008-0574.
77. Bennett C, Nsengimana J, Bostock JA, Cymbalista C, Futers TS, Knight BL, et al. CCAAT/enhancer binding protein α , β and δ gene variants: Associations with obesity related phenotypes in the Leeds Family Study. *Diabetes Vasc Dis Res* 2010;7(3):195-203. doi:10.1177/1479164110366274
78. Lagunas F. Leucemia mieloide aguda. Una perspectiva de los mecanismos moleculares del cáncer. *Gac Mex Oncol* 2016;15(3):150-7. doi: 10.1016/j.gamo.2016.05.007
79. dbSNP Short Genetic Variations [base de datos en línea] Estados Unidos; National Center for Biotechnology Information (NCBI) 2020. [Fecha de acceso 15 de junio de 2021]. URL disponible en: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/snp/rs12691>
80. Trans-Omics for Precision Medicine (TOPMed) Program [base de datos en línea]. Estados Unidos: National, Heart, Lung, and Blood Institute (NHLBI) 2020. [fecha de acceso 15 de junio de 2021] URL disponible en: <https://bravo.sph.umich.edu/freeze5/hg38/variant/19-33300221-G-A>
81. dbSNP Short Genetic Variations [base de datos en línea] Estados Unidos; National Center for Biotechnology Information (NCBI) 2020. [Fecha de acceso 15 de junio de 2021]. URL disponible en: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/snp/rs41490344>
82. Trans-Omics for Precision Medicine (TOPMed) Program [base de datos en línea]. Estados Unidos: National, Heart, Lung, and Blood Institute (NHLBI) 2020. [fecha de acceso 15 de junio de 2021] URL disponible en: <https://bravo.sph.umich.edu/freeze5/hg38/variant/19-33303453-C-T>

83. dbSNP Short Genetic Variations [base de datos en línea] Estados Unidos; National Center for Biotechnology Information (NCBI) 2020. [Fecha de acceso 15 de junio de 2021]. URL disponible en: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/snp/rs41367646>
84. Trans-Omics for Precision Medicine (TOPMed) Program [base de datos en línea]. Estados Unidos: National, Heart, Lung, and Blood Institute (NHLBI) 2020. [fecha de acceso 15 de junio de 2021] URL disponible en: <https://bravo.sph.umich.edu/freeze5/hg38/variant/19-33300977-C-T>
85. Trans-Omics for Precision Medicine (TOPMed) Program [base de datos en línea]. Estados Unidos: National, Heart, Lung, and Blood Institute (NHLBI) 2020. [fecha de acceso 15 de junio de 2021] URL disponible en: <https://bravo.sph.umich.edu/freeze5/hg38/variant/19-33303120-C-T>
86. . Salgado-Balderas K. Identificación de polimorfismos en el gen PPAR γ y su relación con las dislipidemias en sujetos mexicanos con obesidad [Tesis de maestría]. México: Universidad Autónoma de Morelos. Facultad de Medicina; 2016. p.85
87. Santander-Ocampo C. Frecuencias de variantes alélicas relacionadas con obesidad en el dominio de transactivación de PPAR γ en personas jóvenes del estado de Morelos [Tesis de licenciatura]. México: Universidad Autónoma de Morelos. Facultad de Medicina; 2016. p.64
88. Salgado-Córtez G. Identificación de polimorfismos en el gen PPAR γ y su relación con las dislipidemias en sujetos mexicanos con obesidad [Tesis de maestría]. México: Universidad Autónoma de Morelos. Facultad de Medicina; 2020. p.110
89. Moore D, Dowhan D. Preparation and Analysis of DNA. Current Protocols in Molecular Biology. En: Ausubel F, et al editor. John Wiley & sons, inc. 2003.
90. Desjardins P, Conklin D. NanoDrop Microvolume Quantitation of Nucleic Acids. J Vis Exp 2010; 45: 2565. doi: 10.3791/2565
91. Primer BLAST [base de datos en Internet]. USA. National Center for Biotechnology Information. 2019 [Último acceso 12 de marzo de 2020] [1 página]. Disponible en: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/primer-blast/>
92. Akin DF, Oner DA, Kurekci E, Akar N. Determination of CEBPA mutations by next generation sequencing in pediatric acute leukemia. Bratisl Lek Listy 2018; 119(6): 366–72. DOI: 10.4149/BLL_2018_068

93. BLAST Basic Local Alignment Search Tool [base de datos en Internet]. USA. National Center for Biotechnology Information. 2019 [Último acceso 12 de marzo de 2020] [1 página]. Disponible en: <https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>
94. Varadaraj K, Skinner DM. Denaturants or cosolvents improve the specificity of PCR amplification of a G + C-rich DNA using genetically engineered DNA polymerases. *Gene* 1994; 140(1):1-5. doi:10.1016/0378-1119(94)90723-4
95. Chakrabarti R, Schutt CE. The enhancement of PCR amplification by low molecular weight amides. *Nucleic Acids Res* 2001; 29(11):2377-381. doi:10.1093/nar/29.11.2377
96. Zhang Z, Yang X, Meng L, Liu C, Shen C, Yang W. Enhanced amplification of GC-rich DNA with two organic reagents. *BioTechniques* 2009; 47(3):775-9
97. Prediction of functional effects of human nsSNPs [Sede Web]. PolyPhen-2 [Último acceso 20 de diciembre de 2020]. <http://genetics.bwh.harvard.edu/pph2/>
98. Biotecmol. Amplificasa ADN Polimerasa termoestable Disponible en: <http://biotecmol.mx/wp-content/uploads/2017/09/Amplificasa-certificado-analisis-V1.pdf>
99. Speakman JR. Thrifty genes for obesity, an attractive but flawed idea, and an alternative perspective: the 'drifty gene' hypothesis. *Int J Obes (Lond)*. 2008;32(11):1611-7. doi:10.1038/ijo.2008.161
100. Pijl H. Obesity: evolution of a symptom of affluence. *Neth J Med*. 2011;69(4):159-66
101. Kagawa Y, Yanagisawa Y, Hasegawa K, Suzuki H, Yasuda K., et al. Single nucleotide polymorphisms of thrifty genes for energy metabolism: evolutionary origins and prospects for intervention to prevent Obesity-Related diseases. *Biochem Biophys Res Commun*. 2002;295(2):207-22. doi:10.1016/s0006-291x(02)00680-0
102. dbSNP [Sede Web]. USA. National Center for Biotechnology Information. 2020 [Último acceso 1 de diciembre de 2020] [1 página]. Disponible en: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/snp/>
103. Wang ND, Finegold MJ, Bradley A, Ou CN, Abdelsayed SV, Wilde MD, et al. Impaired energy homeostasis in C/EBP alpha knockout mice. *Science*. 1995;269(5227):1108-12. doi:10.1126/science.7652557

15. ANEXOS

Anexo I. Consentimiento informado. Base de datos B



INSTITUTO DE SEGURIDAD Y SERVICIOS SOCIALES PARA LOS
TRABAJADORES DEL ESTADO
CLÍNICA HOSPITAL “DR RAFAEL BARBA OCAMPO”
Puesto de Sangrado y Servicio de Transfusión
Laboratorio de Análisis Clínicos

CARTA DE CONSENTIMIENTO INFORMADO PARA USO DE MUESTRA DE SANGRE EN INVESTIGACIÓN BIOMÉDICA

Investigadores Responsables: Dr. José Ángeles Chimal, MC Verónica Andrade Almaraz y Dr. Rafael Hidalgo Moreno

Institución donde se realizará el estudio: Este protocolo de investigación, es responsabilidad de la Unidad de Diagnóstico y Medicina Molecular “Dr. Ruy Pérez Tamayo” /Hospital del Niño Morelense, de la Facultad de Medicina de la Universidad Autónoma del Estado de Morelos en colaboración con la Clínica Hospital “Dr. Rafael Barba Ocampo” del Instituto de Seguridad y Servicios Sociales para los Trabajadores del Estado, de la Ciudad de HH, Cuautla, Mor.

Fecha: Cuernavaca, Mor. a 15 de junio de 2008.

¿Qué debo saber acerca de este documento?

Este documento es parte de un proceso llamado **Consentimiento Informado**, en el cual se le preguntará si quiere donar su muestra de sangre para que pueda ser utilizada en investigaciones médicas, para que usted pueda decidirlo le daremos toda la información que usted requiere saber para que tome la decisión que usted considere mejor para sus intereses.

- Este documento explica la investigación que se realiza y cuál sería su participación.
- Por favor léala con cuidado y tome el tiempo que sea necesario para entenderla.
- Por favor, haga preguntas en cualquier momento sobre cualquier cosa que no entienda.
- **Usted es un voluntario.** Si decide aceptar donar una fracción de su sangre para investigación puede cambiar de parecer después. Puede decidir retirar su muestra cuando usted quiera. No habrá ningún problema si lo hace, no

perderá beneficios, ni usted ni su familia, en caso de que decida no participar.

- Por favor pida al investigador responsable que le expliquen las palabras que usted no entienda.

¿Por qué se le está pidiendo donar su muestra de sangre?

- Usted ha acudido al puesto de sangrado y servicio de transfusión de la Clínica Hospital "Dr. Rafael Barba Ocampo" del ISSSTE, a fin de donar sangre, con el fin de saber si usted puede donar sangre se le ha tomado una muestra inicial en dos tubos. Normalmente, una vez que se han hecho los estudios para saber si usted puede ser donador, los tubos son destruidos. En esta ocasión, le estamos preguntando si desea donar la sangre contenida en estos tubos para ser usados como fuente de información biológica utilizada en investigaciones biomédica.
- Adicionalmente, del procesamiento de la sangre que donara, se obtiene un producto de desecho conocido como Buffy coat, el cual no tiene ninguna utilidad y se elimina por incineración, por lo se le pide su autorización para que los investigadores principales o personal que ellos designen utilicen este material para preparación de alícuotas de suero, extracción y conservación de material genético para esta y futuras investigaciones.
- Su sangre es una fuente de información biológica de gran utilidad para mejor comprender los procesos que ocurren en el cuerpo humano. Las investigaciones biomédicas que se realizarán usando su muestra de sangre tienen el potencial de aportar conocimientos que permitan ayudar a personas enfermas y/o a prevenir enfermedades.
- Usted, deberá de sentirse satisfecho, pues al mismo tiempo que esta donando sangre para salvar al menos hasta cuatro vidas, también está colaborando a conocer mejor muchos de los procesos que se llevan a cabo en el cuerpo de una persona sana.

¿Quiénes están participando en este banco de información?

- *Se van incorporando nuevos donadores de manera continua y de forma aleatoria, es decir al azar.*

¿Debo hacer algo antes de saber si puedo participar? No

¿Qué pasará si me uno a esta investigación?

- Se tomará de una vena de su brazo una cantidad de sangre que equivale aproximadamente a 10 cucharadas de sangre, su sangre será almacenada en dos tubos y podrá ser utilizada por investigadores autorizados por la Unidad de Diagnóstico y Medicina Molecular de la Facultad de Medicina de la Universidad Autónoma del Estado de Morelos, para realizar investigaciones biomédicas de utilidad para la sociedad morelense. No se requerirá de ninguna otra participación posteriormente.

¿Cuáles son los riesgos y molestias de participar en el estudio?

No existen riesgos previsible de donar su muestra de sangre. La toma de muestra de sangre a partir de su vena se hará en condiciones higiénicas. La toma de muestra puede ocasionar mareo, sudoración, desmayo, baja de presión, moretones. El donar su sangre para investigación biomédica no implica mayores riesgos que la razón inicial por la cual usted acudió a donar sangre.

¿Hay beneficios derivados de participar en el estudio?

No hay ningún beneficio directo para usted de donar su muestra de sangre para investigación biomédica. Los resultados de las investigaciones que usen su muestra podrán ser de beneficio para la sociedad morelense en caso de resultar exitosas y es posible que usted o sus hijos puedan beneficiarse de ellas en un futuro. Sin embargo Ud., tiene el derecho de conocer los resultados parciales de los estudios de laboratorio que se realicen con su muestra, los cuales podrá solicitar después de 15 días de su donación de sangre.

¿A quién debo solicitar los resultados de los exámenes practicados a mi muestra?

Usted podrá acudir en el tiempo antes mencionado, al puesto de sangrado y servicio de transfusión de la clínica Hospital “Dr. Rafael Barba Ocampo” del ISSSTE con el Dr. Rafael Hidalgo Moreno, responsable de este servicio, quien con gusto le entregara sus resultados y si es necesario le dará una interpretación de los mismos.

¿Tendré gastos de participar en este estudio? No, no tendrá ningún gasto.

¿Tendré remuneración económica por donar mi muestra de sangre?

No, no hay ninguna remuneración económica por participar en este estudio. Su participación es enteramente altruista, en beneficio de las investigaciones científicas que se realizan en nuestro estado y en beneficio para la sociedad.

¿Puedo retirar mi muestra de sangre posteriormente?

Si posteriormente usted decide que no quiere que su muestra continúe disponible para su uso en investigación biomédica, usted podrá indicarlo al investigador responsable, el cual inmediatamente procederá a retirarla y destruirla.

¿Cómo protegen mi privacidad?

Los datos personales de las muestras no estarán disponibles para los investigadores que las usen, por lo que ningún investigador podrá saber a quién pertenecen, de esta manera protegemos su confidencialidad. El tiempo que pueda usarse su muestra biológica es indefinida. El investigador principal o personal designado me han dado la seguridad de que no se me identificara en las presentaciones o publicaciones que deriven de este estudio y que los datos relacionados con mi privacidad serán manejados en forma confidencial.

¿A quién me debo dirigir para hacer preguntas?

Si usted tiene alguna pregunta en este momento o en cualquier momento, aún después de haber donado su muestra de sangre puede dirigirse al investigador responsable. Lo puede contactar en:

Dr. José Ángeles Chimal

Unidad de Diagnóstico y Medicina Molecular
Facultad de Medicina
Universidad Autónoma del Estado de Morelos
Tel: (01) 777 10 20 583 de 16 a 21:00 hrs
Correo electrónico: chimal@buzon.uaem.mx

Dr. Rafael Hidalgo Moreno

Puesto de Sangrado y Servicio de Transfusión
Clínica Hospital “Dr. Rafael Barba Ocampo” de la Ciudad de Cuautla, Mor.
Instituto de Seguridad y Servicios Sociales para los Trabajadores del Estado
Tel: (01) 735 de 8:00 a 14:00 hrs
Correo electrónico:

MC. Verónica Andrade Almaraz

Responsable del Laboratorio de Análisis Clínicos
Clínica Hospital “Dr. Rafael Barba Ocampo” de la Ciudad de Cuautla, Mor.
Instituto de Seguridad y Servicios Sociales para los Trabajadores del Estado
Tel: (01) 735 de 8:00 a 16:00 hrs
Correo electrónico:

¿Qué significa su firma en la forma de consentimiento informado?

- Su firma en este documento significa que:
 - Usted entiende la información descrita en el documento.
 - Acepta la responsabilidad y consecuencias indicadas en el documento.
 - Acepta participar en el estudio, libre de influencias
 - Participa en este estudio de manera voluntaria
 - Sus preguntas han sido contestadas a su entera satisfacción
 - No dejará de ejercer sus derechos al firmar el documento.

Por lo cual, manifiesto que he leído y comprendido los términos del consentimiento informado y otorgo al investigador responsable o personal que el designe, mi autorización para que las muestras de sangre antes descritas, sean utilizadas en la investigación biomédica básica.

Cuernavaca, Morelos a del mes de del 2008

Nombre del Donador	Firma
Nombre del médico seleccionador: Dr. Rafael Hidalgo Moreno	Firma

Testigos

Nombre:	Firma
----------------	--------------

MC. Verónica Andrade Almaraz	
Domicilio Intrépidos de Asturias y Loberas #7, Col. Centro, Cuautla, Mor.	Teléfono 7772185697
Nombre: Maritza Barranco Barreto	Firma
Domicilio M. Matamoros #4, Col. Centro, Tlacotepec, Mor.	Teléfono 01 7311704056

Anexo II. Consentimiento informado. Base de datos D

**ESTUDIO DOEM
(DETECCIÓN OPORTUNA DE ENFERMEDADES METABÓLICAS)**

Autorizó
Dr. José Ángeles Chimal

**CARTA DE CONSENTIMIENTO
INFORMADO**

Elaboró
Dr. José Ángeles Chimal
Facultad de Medicina (UAEM)

Revisó
Dr. José Ángeles Chimal
PITC Facultad de Medicina (UAEM)

Por medio de la presente, yo _____ con acepto participar en el proyecto de investigación: **“DETECCIÓN OPORTUNA DE ENFERMEDADES METABÓLICAS (DOEM)”**, estudio observacional, registrado ante el Comité Local de Ética en Investigación de la Universidad Autónomas del Estado de Morelos, con el número **CEI – 0003-2014**. El objetivo de este estudio es detectar

marcadores de riesgo bioquímico, somatométrico o genético para el desarrollo de enfermedades metabólicas o complejas, como la obesidad, enfermedad cardiovascular, síndrome metabólico y/o diabetes, o las que en el futuro se determinases. Estoy enterado(a) de que la obesidad y resistencia a la insulina, entre otros parámetros bioquímicos, están asociadas a otras anormalidades por lo que es importante conocerlas. Se me ha explicado que mi participación en la investigación consiste en autorizar:

- a) Que se me realice una somatometría completa: peso, talla, diámetro de cadera, diámetro de cintura, diámetro de brazo, de muñeca y de cuello. Además, que se obtenga mi composición corporal por bioimpedancia.
- b) Que a la muestra que se me tomó le sean cuantificadas: glucosa sérica en ayuno, hemoglobina glucosilada, colesterol total, perfil de lípidos completo.
- c) Además, contestaré preguntas adicionales a la historia clínica que me hizo el médico pasante en servicio social.
- d) Que se conserven muestras de sangre o sus fracciones para futuros estudios, bioquímicos o genéticos, cuyos hallazgos me serán notificados en su oportunidad.

Declaro que se me ha informado ampliamente que los riesgos e inconvenientes adicionales que representa el estudio son aquellos asociados a la toma inicial de las muestras sanguíneas como parte del proceso de flebotomía, pero no relacionadas con este protocolo, es decir, no se realiza ninguna otra punción venosa para este estudio.

Los investigadores me mantendrán informado acerca de los resultados. Los cuales de ser posible me serán entregados al momento en que estos se encuentren disponibles o la fecha que sea señalada por el personal de la Facultad de Medicina.

Manifiesto que mi participación es voluntaria, sin remuneración económica y entiendo que conservo el derecho de negarme a participar en el estudio o retirarme del mismo, sin que ello afecte el proceso de entrevista médica y control de mi salud en la Facultad de Medicina.

El investigador me ha asegurado que mis datos serán manejados en forma confidencial en las presentaciones o publicaciones de este estudio y que en todo momento se respetará mi privacidad, y me ha proporcionado su número telefónico para cualquier duda 777 3 29 79 48 con el Dr. José Ángeles Chimal.

Nombre y firma del probando

Dr. José Ángeles Chimal
Investigador Principal

Nombre y firma del testigo

Nombre y firma del testigo

**Anexo III. Consentimiento informado. Base de datos E
ESTUDIO DOEM
BASE DE DATOS PARA IDENTIFICAR EL GENOMA DIABESOGÉNICO DEL
ESTADO DE MORELOS**

**CARTA DE CONSENTIMIENTO
INFORMADO**

Elaboró

*QBP. Gabriela Salgado Cortez r
Facultad de Medicina (UAEM)*

Revisó

*Dra. Luz María González Robledo
PITC Facultad de Medicina (UAEM)*

Autorizó

Dr. Jesús Santa Olalla Tapia

Estimado participante:

Se le está pidiendo que participe en un estudio de investigación. Antes que tome una decisión, es importante que entienda por qué se está realizando la investigación, lo que está involucrándolo, así como los posibles beneficios, riesgos y malestares. Por favor tómese su tiempo para leer detalladamente la siguiente información y discutirla con el investigador asociado, si así lo desea.

Se está realizando un estudio cuyo título es: **“identificación de nuevos polimorfismos en el dominio unión al ADN en PPAR γ y su frecuencia en dislipidemias en voluntarios jóvenes Del Estado de Morelos”** el cual forma parte de un proyecto más amplio titulado **“base de datos para identificar y genoma diabesogénico en Morelos”** Estudio registrado y aprobado ante el comité local de investigación del Instituto Mexicano del Seguro Social con los número **R-2007-1701-12**, Y registrado en la Facultad de Medicina con el número **2017-77**. la finalidad del estudio es identificar variantes de genes para ser empleados como marcadores de riesgo bioquímico, somatométrico y/o genético para el desarrollo de enfermedades metabólicas, como la obesidad, dislipidemias, diabetes, hipertensión, síndrome metabólico y/o enfermedad cardiovascular, o con las que en el futuro se determinen. La obesidad y la resistencia a la insulina, entre otros parámetros bioquímicos, están asociados a anormalidades cardiovasculares por lo que es importante conocerlas.

Si decide participar en el estudio, usted autoriza lo siguiente:

- a) Que se le realice una somatometría completa la cual consiste en la medición de peso, talla, diámetro de cadera, diámetro de cintura, diámetro de brazo, diámetro de muñeca y cuello y composición corporal.
- b) Que se tomen muestras de sangre por venopunción, con un total de 20 ml, para cuantificar: glucosa sérica en ayuno y perfil de lípidos que incluye

colesterol total, triglicéridos, colesterol HDL y LDL. Además, se utilizará para purificación de ácidos nucleicos para estudios genéticos.

- c) Que responda un cuestionario con preguntas sobre sus datos personales, Sociodemográficos, antecedentes hereditarios de la familia, preguntas relacionadas a enfermedades actuales o previas, hábitos y estilos de vida
- d) Que se conserven en sus muestras de sangre a sus reacciones para futuros estudios, bioquímicos o genéticos, Cuyos hallazgos le serán notificados en su oportunidad.

Los riesgos e inconvenientes que representa el estudio son mínimos y están asociados a la forma inicial de las muestras sanguíneas. Estas pueden llegar a causar un ligero dolor que desaparecerá inmediatamente, sensación de mareo generalmente es causado por nerviosismo o estrés, por lo cual se recomienda mantenerse tranquilo y permanecer sentado y, en algunos casos, puede presentarse un moretón en el sitio de punción que no pone en peligro su brazo y no requiere de tratamiento, Ésta desaparecerá entre 1 y 2 semanas. En cuanto a las preguntas de los cuestionarios, si alguno le hace sentir incómodo (a), tiene el derecho de no responderla.

Los investigadores le entregaran los resultados de las pruebas realizadas en la fecha que sea señalada por personal de la Facultad de Medicina. En el caso de encontrar valores alterados en las pruebas bioquímicas, se le indicará que acuda con su médico familiar o de preferencia, para su valoración, diagnóstico y toma de decisiones.

Su participación es voluntaria y si bien no recibirán ninguna remuneración económica, usted obtendrá como beneficio los resultados de las pruebas bioquímicas, genéticas y somatométricas. Además, usted conserva el derecho de negarse a participar en el estudio retirarse del mismo en cualquier momento, sin

que ello afecte el proceso de entrevista médica y control de su salud o situación académica en la Universidad autónoma del Estado de Morelos.

El investigador le asegura que sus datos serán manejados en forma confidencial mediante la asignación de un código único que será utilizado tanto en las pruebas bioquímicas como en las mediciones somatométricas, genéticas y cuestionarios para evitar que sus datos personales aparezcan. De esta manera, se mantendrá su anonimato en las presentaciones o publicaciones que se realicen en el presente estudio respetando en todo momento su privacidad.

En caso de duda podrá realizar todas las preguntas para lo cual se le proporcionará número telefónico para cualquier duda del investigador responsable 777 3 29 70 00 ext. 3469 Con el Dr. Jesús Santa Olalla Tapia o al correo electrónico jsa@uaem.mx.

Antes de firmar le pedimos que nos manifieste cualquier duda o pregunta referente a este estudio.

Su firma indica su aceptación a participar voluntariamente en la presente investigación.

ALINEAR LOS NOMBRES

Nombre y firma del participante

Dr. Jesús Santa Olalla Tapia
Investigador principal

QBP. Gabriela Salgado Cortez
Investigadora asociada

Nombre y firma del testigo
testigo

Nombre y firma del

Datos de contacto del paciente:

Número de teléfono: _____

Correo electrónico: _____

Anexo IV. SNPs encontrados en el sitio de unión al ADN por voluntario

VOLUNTARIO	SNPS SITIOS DE UNION AL ADN														CANTIDAD	SEXO	EDAD	IMC
B036					G5863C	C5865A	C5867A	A5871G	A 5810C						5	HOMBRE	23	36
E107					G5863C	C5865A	C5867G								3	HOMBRE	24	33.08
E121								A5871G							1	HOMBRE	21	32.7
D060				T 5857G											1	HOMBRE	22	32.06
D069							C5867A								1	MUJER	19	31.95
E161						C5865A									1	MUJER	20	30.7
D066						C5865A	C5867A								2	MUJER	20	29.12
D057			G5862C									G5858A			2	MUJER	19	28.57
E162													G5835T	C 5846T	2	MUJER	22	27.5
D122								A5871G				G5870A			2	HOMBRE	19	27.37
D088					G5863C				A 5810C						2	MUJER	19	27.33
D078		C5856A	G5862C			C5865T									3	MUJER	18	26.96
E136								A5871G							1	MUJER	21	26.4
D111		C5856A	G5862C			C5865A	C5867A			T5868G					5	HOMBRE	20	26.16
D133	C5838T	C5856A		T 5857G	G5863C	C5865A	C5867G								6	HOMBRE	18	26.15
D061								A5871G							1	HOMBRE	20	25.32

Anexo V. SNPs encontrados en el resto de la secuencia por voluntario

VOLUNTARIO	SNPs RESTO DE LA SECUENCIA																CANTIDAD	SEXO	EDAD	IMC
B036										A5948T							2	HOMBRE	23	36
E107										A5948T							2	HOMBRE	24	33.08
E121																G5907T	1	HOMBRE	21	32.7
D060						C 5904T	G5905T	A5906T									3	HOMBRE	22	32.06
D069															G5924A	G5935A	2	MUJER	19	31.95
E161								A5906T							G5907T		2	MUJER	20	30.7
D066	G5921A			G5903T		C 5904T											3	MUJER	20	29.12
D057			G5950T		G5960A					G5882C							3	MUJER	19	28.57
D010	G5921A	C5931A	G5950T														3	HOMBRE	19	28.09
E162		C5931A															1	MUJER	22	27.5
D122															G5910A	G5934A	2	HOMBRE	19	27.37
D075																C5922T	1	MUJER	25	27.36
D088								G5905C							C5881G		2	MUJER	19	27.33
D037								A5906T							G5907T		2	HOMBRE	19	26.98
E132															G5910A	G5934A	2	MUJER	20	26.9
D072			G5950T	G5903T		C 5904T	G5905T										3	MUJER	19	26.5
E136															G5907T		1	MUJER	21	26.4
D111				G5903T	G5960A		G5905T										3	HOMBRE	20	26.16
D133				G5903C													1	HOMBRE	18	26.15
D061															G5907T		1	HOMBRE	20	25.32
D029															G5907T		1	MUJER	18	25.19