



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO  
FACULTAD DE QUÍMICA

---

---

ESTUDIO DEL EFECTO DE LA VARIANTE -565 C>T DEL GEN  
ABCA1 SOBRE EL RIESGO PARA OBESIDAD Y SUS  
COMORBILIDADES EN LA POBLACIÓN MESTIZA MEXICANA.

**T E S I S**

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:

**QUÍMICO FARMACÉUTICO BIÓLOGO**

**P R E S E N T A:**

**GUSTAVO PÉREZ ORTIZ**



MÉXICO, D. F.

2011



Universidad Nacional  
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

**Biblioteca Central**



**UNAM – Dirección General de Bibliotecas**  
**Tesis Digitales**  
**Restricciones de uso**

**DERECHOS RESERVADOS ©**  
**PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL**

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.



## **Jurado Asignado:**

Presidente	<b>Jose Pedraza Chaverri</b>
Vocal	<b>Marco Antonio Cerbón Cervantes</b>
Secretario	<b>María Teresa Tusié Luna</b>
1er suplente	<b>Marta Alicia Menjivar Iraheta</b>
2do suplente	<b>Martha Patricia Coello Coutiño</b>

La tesis fue realizada en **La Unidad Periférica de Biología Molecular y Medicina Génómica del Instituto de Investigaciones Biomédicas** ubicado en el **Instituto Nacional de Ciencias Medicas y Nutrición Salvador Zubirán.**

Asesor.

**Dra. María Teresa Tusié Luna**

---

Sustentante.

**Gustavo Perez Ortiz**

---

*Para Gustavo,  
mi abuelo...*

## Agradecimientos

Mi profundo agradecimiento a la *Dra. Hortensia Moreno Macías* por su asesoría e instrucción en el análisis de datos, por su apoyo en la revisión y al constituir una parte muy importante de este proyecto.

A la *Bióloga María Luisa Ordoñez* le agradezco la instrucción técnica, la paciencia para enseñarme, su ayuda en el trabajo diario en el procesamiento de las muestras, por compartir conmigo su experiencia, sus conocimientos y su tiempo, por la confianza y por su amistad.

Agradezco también a M. en C. Rosario Rodríguez y a Angelica Flores, por su ayuda en el acceso a las bases de datos, por la búsqueda y extracción de muestras, por los gratos momentos y por aceptarme en su lado del laboratorio.

Agradezco la disposición de M en C. Laura Riba y Biól. Salvador Ramirez en el apoyo técnico.

Reconozco a M. en C. Alicia Huerta, M. en C. Marco Alberto Gamboa, M. en C. Paola Vázquez y M. en C. Teresa Guerra por su trabajo en la construcción de las bases de datos y la identificación de las muestras.

Por último, quiero agradecer a todos aquellos que estuvieron conmigo a lo largo de mi carrera, a mis amigos del bachillerato, a mis compañeros de la facultad; mis compañeros del laboratorio Erika y Agnán. A Lupita, a mi hermano y de manera muy especial, a mis papás, Paco y Mily, que a pesar de que conocen la peor parte de mi, aun siguen apoyándome.

Gracias.

# Índice

<b>I. Introducción</b>	1
<b>II. Obesidad</b>	3
Origen de la obesidad.	4
Prevalencia de la obesidad por género.	5
Prevalencia de la obesidad por grupos de edad.	5
Efecto de la disminución de la actividad física.	6
Influencia de los factores endocrinológicos en la obesidad.	6
Efecto de los factores ambientales en la obesidad.	7
<b>III. Obesidad mórbida</b>	8
Fenotipo obeso metabólicamente sano.	9
<b>IV. Diabetes</b>	12
Diabetes tipo 1.	12
Diabetes tipo 2.	13
DT2 de inicio temprano.	14
DT2 de inicio tardío.	14
Evaluación del modelo homeostático HOMA.	14
Diabetes tipo 2 y obesidad.	15
Síntesis, secreción y acción de la insulina.	15
<b>V. El colesterol y la lipotoxicidad mediada por colesterol</b>	19
Transporte reverso del colesterol.	19
Lipotoxicidad por colesterol.	21
<b>VI. Gen ABCA1</b>	23
Estructura del gen.	23
Estructura de la proteína.	23
Regulación de la expresión del gen.	25
Variabilidad del gen ABCA1	25
<b>VII. Estrategias de estudio del componente genético de la obesidad y la DT2</b>	28
Análisis de ligamiento.	29
Análisis de asociación. Análisis de genes candidatos.	29
Análisis de asociación. Análisis de asociación del genoma completo.	30
Definición de las causas genéticas de DT2 y obesidad en la población mexicana.	32
<b>VIII. Justificación</b>	34
<b>IX. Hipótesis</b>	35
<b>X. Objetivos</b>	36
<b>XI. Diseño Experimental y Metodología</b>	37
Población abierta.	37
Población caso-control para el estudio de obesidad.	38
Población de sujetos con obesidad mórbida.	39
Subgrupos de pacientes diabéticos y controles.	39
Determinación de los parámetros clínicos y bioquímicos.	40

Extracción de DNA a partir de sangre venosa (QIAamp 96 plates blood kit Qiagen®).	41
Cuantificación de DNA (espectrofotometría).	42
Revisión de la integridad del DNA (electroforesis en gel de agarosa).	43
Amplificación de la región promotora del gen ABCA1 para la evaluación del SNP -565C>T de ABCA1 (reacción en cadena de la polimerasa).	44
Purificación en columna de membrana (QIAquick PCR purification kit, Qiagen®)	46
Secuenciación del fragmento e identificación de la variante -565C>T de ABCA1 (secuenciación automatizada).	47
Genotipificación de las muestras (discriminación alélica por PCR en tiempo real con sondas Taqman®).	49
Genotipificación en plataforma comercial Kbiosciences®.	50
Análisis estadístico. Equilibrio de Hardy Weinberg.	51
Análisis estadístico de las variables.	52
<b>XII. Resultados</b>	53
Secuenciación parcial del promotor de ABCA1.	53
Genotipificación de la variante -565C>T de ABCA1 por RT-PCR con sondas Taqman®.	53
Genotipificación con la plataforma comercial Kbiosciences®.	54
Características clínicas y bioquímicas de los grupos de estudio de obesidad.	54
Asociación de -565C>T de ABCA1 con obesidad / obesidad mórbida.	57
Comparación de los rasgos metabólicos de los sujetos delgados, obesos y obesos mórbidos de acuerdo a la variante -565C>T de ABCA1.	58
Descripción de las frecuencias fenotípicas y alélicas de -565C>T de ABCA1 en subgrupos de DT2.	61
<b>XIII. Discusión</b>	65
Participación de la variante -565C>T de ABCA1 en el desarrollo de obesidad.	65
Posible efecto de -565C>T en los niveles de HDL y otros rasgos metabólicos.	67
Posible participación de ABCA1 y el desarrollo de DT2.	69
Limitaciones del estudio.	70
<b>XIV. Conclusiones.</b>	72
<b>XV. Bibliografía.</b>	74



## Índice de tablas

<b>Tabla 1.</b> Clasificación del estado de nutrición de acuerdo al IMC.	4
<b>Tabla 2.</b> Criterios de inclusión para el estudio de asociación caso-control para obesidad.	38
<b>Tabla 3.</b> Oligonucleótidos utilizados para amplificar la región promotora del gen ABCA1.	45
<b>Tabla 4.</b> Volúmenes para la preparación de la mezcla de reacción para la reacción de PCR.	46
<b>Tabla 5.</b> Ciclo de PCR para la amplificación del fragmento del promotor de ABCA1.	46
<b>Tabla 6.</b> Volúmenes para la preparación de la mezcla de reacción para la reacción de incorporación para secuenciación directa.	48
<b>Tabla 7.</b> Ciclo de PCR para la reacción de incorporación.	48
<b>Tabla 8.</b> Características clínicas y bioquímicas de los grupos de estudio de obesidad.	56
<b>Tabla 9.</b> Frecuencias genotípicas y alélicas del SNP -565C>T del promotor de ABCA1 en sujetos delgados, obesos y obesos mórbidos.	57
<b>Tabla 10.</b> Asociación de la variante -565C>T de ABCA1 con obesidad.	57
<b>Tabla 11.</b> Asociación de la variante -565C>T de ABCA1 entre obesidad vs obesidad mórbida.	58
<b>Tabla 12.</b> Asociación de la variante -565C>T de ABCA1 entre MHO vs No-MHO.	58
<b>Tabla 13.</b> Asociación de la variante -565C>T de ABCA1 con rasgos cuantitativos en sujetos delgados.	59
<b>Tabla 14.</b> Asociación de la variante -565C>T de ABCA1 con rasgos cuantitativos en sujetos obesos.	60
<b>Tabla 15.</b> Asociación de la variante -565C>T de ABCA1 con rasgos cuantitativos en sujetos obesos mórbidos.	61
<b>Tabla 16.</b> Características clínicas y bioquímicas de los subgrupos de individuos diabéticos y controles no diabéticos.	62
<b>Tabla 17.</b> Frecuencias genotípicas y alélicas del SNP -565C>T de ABCA1 en subgrupos de DT2.	64

## Índice de figuras

<b>Figura 1.</b> Esquema que representa los factores que aumentan la concentración de glucosa en sangre y generan hiperglucemia.	12
<b>Figura 2.</b> Secreción de insulina en la célula $\beta$ pancreática.	16
<b>Figura 3.</b> Acción de la insulina en el tejido periférico.	18
<b>Figura 4.</b> Transporte reverso del colesterol.	20
<b>Figura 5.</b> Potencial papel del gen ABCA1 y el colesterol en la función de la célula $\beta$ .	22
<b>Figura 6.</b> Estructura del transportador dependiente de ATP subfamilia A tipo 1 (ABCA1).	24
<b>Figura 7.</b> Actividad <i>in vitro</i> de la variante -565C>T del promotor del gen ABCA1.	26
<b>Figura 8.</b> Electroferograma de 3 individuos.	53
<b>Figura 9.</b> Genotipificación de la variante -565C>T del promotor de ABCA1 por discriminación alélica con sondas Taqman®.	54

## Lista de Abreviaturas

**ABCA1:** Transportador dependiente de ATP familia A tipo 1 (*ATP Binding Cassette A1*).

**ADA:** Asociación Americana de Diabetes (*American Diabetes Association*).

**CTOG:** Curva de Tolerancia Oral a la Glucosa.

**DNA:** Ácido Desoxirribonucleico (*Deoxyribonucleic Acid*).

**DT1:** Diabetes Tipo 1.

**DT2:** Diabetes Tipo 2.

**ENSA:** Encuesta Nacional de Salud.

**ENSANUT:** Encuesta Nacional de Salud y Nutrición.

**GWAS:** Estudio de Asociación del Genoma Completo (*Genome Wide Association Studies*).

**HDL:** Lipoproteína de Alta Densidad (*High Density Lipoprotein*).

**HOMA:** Evaluación del Modelo Homeostático (*Homeostasis Model Assessment*).

**HTA:** Hipertensión Arterial.

**IMC:** Índice de Masa Corporal.

**INCMNSZ:** Instituto Nacional de Ciencias Médicas y Nutrición Salvador Zubirán.

**LDL:** Lipoproteína de Baja Densidad (*Low Density Lipoprotein*).

**MHO:** Obeso Metabólicamente Sano (*Metabolically Healthy Obese*).

**MODY:** Diabetes del Adulto en el Joven (*Maturity Onset Diabetes of the Young*).

**OMS:** Organización Mundial de la Salud.

**OR:** Razón de Momios (*Odds Ratio*).

**PCR:** Reacción en Cadena de la Polimerasa (*Polymerase Chain Reaction*).

**SNP:** Polimorfismo de un Solo Nucleótido (*Single Nucleotide Polymorphism*).

**TG:** Triglicéridos

*To live outside the law, you must be honest.*

*Bob Dylan, Absolutely Sweet Marie.*

*El hombre (cada hombre) es un fin en sí mismo, no el medio para los fines de otros. Debe existir por su propio esfuerzo, sin sacrificarse a otros ni sacrificar a otros para sí. La búsqueda de su propio interés racional y de su propia felicidad es el más alto propósito moral de su vida.*

*Ayn Rand*

## Resumen

En Junio de 1997, la Organización Mundial de la Salud reconoció que la obesidad debía ser considerada como una enfermedad en sí misma. En México, la prevalencia de la obesidad y la obesidad mórbida han aumentado. En mujeres, la obesidad mórbida aumentó en 48% del año 2000 al 2006.

Por su parte, la prevalencia de diabetes tipo 2 (DT2) en México se ha incrementado al menos 10 veces en los últimos 25 años. La obesidad es considerada el principal factor de riesgo para desarrollar DT2.

El transportador ABCA1 es el principal mediador en el proceso de transporte reverso del colesterol. En la población mexicana, se informó de la asociación del polimorfismo R230C de ABCA1 con obesidad y con DT2 de inicio temprano. Para el polimorfismo de un solo nucleótido (SNP) -565C>T de ABCA1 se desconoce su frecuencia en la población mestiza mexicana, además de sus posibles asociaciones a distintos rasgos metabólicos y fenotipos clínicos.

En este proyecto, nos propusimos determinar la frecuencia de esta variante en una muestra de población abierta, describir su posible asociación a distintos rasgos como la obesidad y la obesidad mórbida en grupos de sujetos caso/control, además de describir la frecuencia de la variante en subgrupos bien determinados de pacientes con DT2.

El alelo T (alelo de riesgo) del SNP -565C>T de ABCA1 presentó una de las frecuencias más altas descritas en la literatura (0.545) y su frecuencia presentó diferencias significativas con la descrita para poblaciones europeas. Se evidenció la asociación del SNP -565C>T de ABCA1 a la obesidad mórbida, lo que sugiere que esta variante pudiera ser un marcador para la obesidad mórbida. Será importante realizar el estudio de ancestría para validar la asociación encontrada. El sondeo de la variante en distintos subgrupos (n=30) de DT2 no presentó diferencias significativas con los controles, sin embargo, tampoco se descarta que pudieran encontrarse asociaciones en una muestra mayor individuos, particularmente, en aquellos con un defecto severo en la secreción de insulina o en individuos con DT2 de inicio temprano, tal como se ha reportado para la variante R230C de ABCA1.

## I. Introducción

En Junio de 1997, la Organización Mundial de la Salud (OMS) reconoció que la obesidad debía ser considerada como una enfermedad en sí misma. Para el año 1998, la obesidad fue considerada como una epidemia mundial (1).

En México, la prevalencia de la obesidad representa un problema alarmante por su acelerado incremento. El reporte de la Encuesta Nacional de Salud (ENSA) 2000 arrojó una prevalencia de obesidad en adultos mayores de 20 años del 28.1% en mujeres y de 18.6% en hombres, considerando un IMC igual o mayor a 30 Kg/m<sup>2</sup> (2). Para el año 2006, el 34.5% de las mujeres y el 24.2% de los hombres mayores de 20 años presentaron obesidad, dato obtenido en la Encuesta Nacional de Salud y Nutrición (ENSANUT) 2006 (3).

Por otra lado, para el año 2000, se calculó que habían 171 millones de diabéticos alrededor del mundo, se estima que esta cifra aumente a 366 millones para el año 2030 (4). En el 2010, México ocupó el décimo lugar entre los países con más casos de diabetes reportados entre los 20 a 79 años de edad, con 6.8 millones de casos (5). El mismo autor señala, que de seguir esta tendencia, para el año 2030, México ocupará el lugar número 7 en el mundo con 11.9 millones de pacientes diabéticos (5).

Del total de casos de diabetes en México en el año 2006, el 21.5% tienen entre 20 y 40 años de edad. Este porcentaje de casos de diagnóstico temprano ha aumentado también con respecto a lo reportado en el año 2000 cuando la prevalencia era del 13.2%, lo que indica un alarmante incremento en casos de diabetes de inicio temprano (2,3).

Además, la prevalencia de hipertensión arterial (HTA) en México va en aumento. Se estiman más de 15 millones de sujetos hipertensos de entre 20 y 69 años de edad. La diabetes, el tabaquismo y la obesidad incrementan de manera notable el riesgo de hipertensión arterial (6).

Este alarmante aumento en la prevalencia de obesidad y otros padecimientos crónicos asociados como la diabetes tipo 2 (DT2), hipertensión arterial y distintas dislipidemias en la población mexicana se ha convertido en un desafío a los sistemas

de salud en México, debido al enorme impacto socio-económico de la enfermedad. El entendimiento de las bases genéticas de estos padecimientos representa la estrategia más prometedora para su tratamiento y control (7).

Identificar las causas genéticas de la DT2, la obesidad y la hipertensión arterial nos permitirá identificar nuevos blancos terapéuticos que impactaran en la forma en que se tratan estos padecimientos y las complicaciones asociadas. Además, la identificación de los genes involucrados en el desarrollo de la obesidad será esencial para entender la influencia de los factores ambientales en la enfermedad (7).

## II. Obesidad

La obesidad se caracteriza por un balance positivo de energía, donde la ingesta de calorías excede al gasto energético, ocasionando un aumento en los depósitos de la grasa corporal (aumento en la adiposidad) y por lo tanto ganancia de peso (8). Esta ganancia de peso, pone en riesgo la salud del individuo (8).

La obesidad, al igual que la diabetes, es una enfermedad compleja. En este tipo de padecimientos, los genes involucrados ejercen solo un efecto parcial (genes de susceptibilidad), por lo que el efecto de un solo gen no es suficiente para causar la enfermedad. El padecimiento se desarrolla entonces, solo cuando varios de estos genes están alterados y además, están presentes ciertos factores de riesgo que favorecen la expresión de estos genes, tales como el sedentarismo, el estrés, la malnutrición (dieta alta en grasas y carbohidratos), entre otros (7).

La obesidad está asociada a un gran número de problemas sociales debido a los prejuicios existentes hacia la obesidad en la cultura occidental. Los individuos obesos son menos aceptados en los colegios, tienen más dificultades para encontrar trabajo y cuando lo encuentran sus salarios son menores que las personas con peso normal (9).

Para calificar el estado de obesidad de un individuo, no se puede partir solo del peso corporal del mismo, ya que el peso corporal se modifica principalmente por la estatura. Por lo tanto, es necesario un valor que exprese el grado de obesidad de una persona independientemente de su estatura. Para ello, se calcula el índice de masa corporal (IMC) el cual se define como el peso corporal en kilogramos sobre el cuadrado de la estatura en metro cuadrados ( $\text{Kg}/\text{m}^2$ ). El IMC se interpreta como la forma en que el peso corporal se distribuye por el cuerpo (10).

La Organización Mundial de la Salud (OMS) y el Instituto Nacional de Salud de Estados Unidos, propusieron puntos de corte importantes basados en el IMC: se consideran delgados aquellos individuos con IMC de entre 18.5 y 24.9  $\text{Kg}/\text{m}^2$ , un IMC mayor a 25  $\text{Kg}/\text{m}^2$  se considera como sobrepeso mientras que un IMC superior a 30  $\text{Kg}/\text{m}^2$  se clasifica como obesidad (1,11).

Un  $\text{IMC} \geq 30 \text{ Kg}/\text{m}^2$  y  $< 35 \text{ Kg}/\text{m}^2$  se clasifica como obesidad tipo I. De un  $\text{IMC} \geq 35$



Kg/m<sup>2</sup> y < 40 Kg/m<sup>2</sup> se clasifica como obesidad tipo II. Otro estado de obesidad más severo (obesidad tipo III), conocido como obesidad mórbida, se determina con un índice de masa corporal superior a 40 Kg/m<sup>2</sup> (1,11).

**Tabla 1.** Clasificación del estado de nutrición de acuerdo al IMC.

Clasificación	IMC (Kg/m <sup>2</sup> )
Peso normal	18.5 – 24.9
Sobrepeso	25.0 – 29.9
Obesidad tipo I	30.0 – 34.5
Obesidad tipo II	35.0 – 39.9
Obesidad tipo III	> 40.0

Como no es posible discernir si, el exceso de peso es producto de la acumulación de grasa (obesidad) o bien, a un aumento en la masa muscular, como en el caso de algunos deportistas, o algunas otras causas, como enfermedades que producen edema, es necesario el uso de otras determinaciones alternas (12).

La distribución de la grasa corporal puede tener un predominio superior (obesidad central o androide) o inferior (obesidad periférica o ginoide). En la primera, más propia de los varones, la grasa se acumula sobre todo en la cara, región cervical, tronco y región supraumbilical, y también aumenta de modo notable la grasa abdominal profunda (obesidad visceral) (12).

La acumulación de grasa en la región abdominal (obesidad central) se asocia con patologías como las enfermedades cardiovasculares. De hecho, estudios epidemiológicos sugieren que entre el 65 y 75% del riesgo para hipertensión arterial es atribuido al exceso de peso (13, 14).

La medición de la circunferencia de cintura (CC) es un valor aceptado para determinar el exceso de tejido graso en la zona abdominal. La OMS considera que hombres con CC mayor a 102 cm y mujeres con CC mayor a 88 cm se consideran en riesgo de desarrollar enfermedades cardiovasculares (1).

### **Origen de la obesidad.**

La obesidad podría explicarse como resultado de un desbalance producido cuando la cantidad de calorías que se ingieren superan los requerimientos para mantener las

funciones corporales y la actividad física del individuo. Esto genera un exceso de energía que es almacenada en el tejido adiposo. Sin embargo, debido a la complejidad de los mecanismos metabólicos y neuro-endocrinos que regulan la ingesta de alimento y el gasto energético, a sido difícil determinar los factores genéticos y moleculares implicados en el desarrollo de la obesidad (15).

### **Prevalencia de la obesidad por género.**

En el año 2000, en México, la prevalencia de obesidad es mayor en mujeres que en hombres (2). Asimismo, la prevalencia de obesidad en la ENSANUT 2006 fue mayor en mujeres (34.5%) que en hombres (24.2%) (3).

Esta tendencia es resultado de las características biológicas, psicologías y sociales del sexo femenino. Las mujeres tienen mayor prevalencia de trastornos de la conducta alimentaria. Adicionalmente, algunos estudios muestran mayor prevalencia de depresión y ansiedad entre las mujeres con obesidad. Estos factores psicológicos son a la vez, causa y consecuencia de la obesidad (16). El embarazo favorece la obesidad, como lo sugieren los datos que muestran una asociación entre el número de embarazos y el aumento de peso (16).

Durante la gestación se producen serios cambios hormonales y psicológicos que en ocasiones, se acompañan de un aumento en la ingesta. El resultado final puede ser un excesivo aumento de peso, con un cambio en los hábitos alimentarios (12). Con la llegada de un hijo suele aumentar la ansiedad de la madre, esto promueve también la ingesta excesiva de alimentos (12).

### **Prevalencia de la obesidad por grupos de edad.**

La prevalencia de la obesidad tiende a incrementarse con la edad hasta los 60 años (3). De los 60 y más de 80 años de edad, la obesidad disminuye tanto en hombres como en mujeres (3).

La disminución en la prevalencia de sobrepeso y obesidad en las décadas más tardías de la vida puede explicarse por varias razones; la primera es el mayor riesgo de muerte en los sujetos que tienen sobrepeso y obesidad, lo que llevaría a una selección o sesgo donde se observa una mayor sobrevivencia de los sujetos con IMC adecuado; la segunda es la pérdida de peso ocasionada por enfermedades

crónicas y degenerativas como DT2 y la enfermedad de Parkinson, entre otras, que son altamente prevalentes en adultos mayores; la tercera es la desnutrición carencial debida a menor protección social o a la depresión y el deterioro fisiológico que suele suceder durante la senectud (3).

### **Efecto de la disminución de la actividad física.**

Paralelamente a la disminución del ejercicio, se produce un descenso de las necesidades energéticas, que muchas veces no se acompaña de una disminución en la ingesta, lo que da como resultado un aumento progresivo de peso. Este efecto es más acentuado en los deportistas de elite o en aquellos que dedican varias horas al día a la práctica de ejercicio físico (12).

La vida sedentaria, propia del mundo occidental es en parte, responsable del incremento de la prevalencia de obesidad. La serie de ventajas que representan el progreso, como ascensores, automóviles, mandos a distancia, etc., conllevan un ahorro de energía importante que puede derivar en un aumento de peso (12).

### **Influencia de los factores endocrinológicos en la obesidad.**

La menor proporción de los casos de obesidad parece deberse a anomalías endocrinas. Algunas de estas son el hipotiroidismo, el síndrome de Cushing, el hiperandrogenismo, el síndrome de ovario poliquísticos y la resistencia a la insulina, incluyendo la DT2. Se ha demostrado recientemente la participación de hormonas y péptidos que modulan el almacenamiento de grasa y el equilibrio energético en los humanos (17).

La obesidad es parte del síndrome de Stein-Leventhal que se caracteriza por oligomenorrea o amenorrea, hirsutismo y aumento progresivo de peso. La causa de la alteración es compleja y no del todo conocida, y con frecuencia existe también una hiperfunción suprarrenal (12).

La hiperinsulinemia en la diabetes tipo 2 o bien en pacientes que precisan insulina favorece el desarrollo de obesidad. Esto se debe a que la insulina es una hormona con efecto anabólico que favorece la síntesis de grasa y su depósito en el tejido adiposo (12).

La hiperfunción suprarrenal cursa con aumento de la producción de glucocorticoides

como sucede en el síndrome de Cushing, que conlleva un incremento de peso con una distribución característica de la grasa en la región faciotroncular del cuerpo (12).

### **Efectos de los factores ambientales en la obesidad.**

El enorme incremento en la prevalencia de la obesidad en poblaciones cuyos antecedentes genéticos han permanecido relativamente estables, sugiere que los factores ambientales pueden tener una importancia considerable (18,19). Los modelos nutricionales y de actividad física se han modificado por el proceso de modernización y reestructuración socioeconómica en los países desarrollados y en vías de desarrollo (20).

Existe otro número de factores que pueden estar implicados en la patogénesis de la obesidad, como son el exceso de alimentación durante el periodo prenatal y de lactancia, la malnutrición materna, el tipo de estructura familiar (hijo único, hijos adoptados, el último hijo de una gran familia, padres separados, familia monoparental, madre mayor de 35 años, familia numerosa), el nivel socioeconómico (clase social baja en los países desarrollados y clase social alta en países en vías de desarrollo), factores relacionados con el clima, dietas hiperenergéticas, la falta de ejercicio físico y el fácil acceso a la comida (21).

### III. Obesidad mórbida

En los últimos años, en nuestro país se ha observado una tendencia creciente de la prevalencia de obesidad, sin embargo, las tendencias de la obesidad mórbida son menos conocidas.

Estudios en Estados Unidos han encontrado una tendencia creciente en la prevalencia de obesidad mórbida, que aumenta más rápidamente que aquella relacionada con grados menos severos de obesidad (22). Se ha descrito que la obesidad mórbida es más prevalente en los niveles socioeconómicos bajos y que es más frecuente en mujeres, fundamentalmente mujeres mayores de 50 años (23). En ese mismo país, se han publicado estimaciones de que entre 1990 y el 2000 la prevalencia de obesidad mórbida se multiplicó por 3 en varones y sólo por 2,3 en mujeres, aunque las mujeres seguían presentando mayor prevalencia (24).

En España, de 1993 a el 2006, la prevalencia de obesidad mórbida aumentó en más de un 200%, pues pasó del 1.8% al 6.1%. Por otro lado, en 1993, el 7.7% de los adultos tenían un  $IMC \geq 30$  pero  $< 35$ , y en 2006 ya representaban el 11,9%, lo que supuso un incremento del 54%. Por lo tanto, se considera que la prevalencia de la obesidad clínicamente severa (obesidad mórbida) está incrementándose más rápidamente que la obesidad (25).

En México, la prevalencia de obesidad mórbida se ha incrementado también. En mujeres, la prevalencia aumentó en un 48% (de 2.5% en el año 2000 a un 3.7% en el 2006). En este mismo período, en hombres, la prevalencia de obesidad mórbida fue aumentando, pero fue menor que aquella observada en mujeres (de 0.9% a 1.1%) (26).

La obesidad mórbida u obesidad tipo III, es una enfermedad grave y potencialmente mortal que ha recibido poca atención en las últimas décadas a juzgar por el número de reportes en la literatura científica. Una forma de clasificar a la obesidad mórbida es por una ganancia de 45 Kg de peso o 100% sobre el peso ideal, con un  $IMC > 40$   $Kg/m^2$  (23). En cuanto a la etiopatogenia de la obesidad mórbida, se describen factores genéticos y psicológicos en el desarrollo de la misma. Aunque ambos factores no son mutuamente excluyentes, los factores genéticos jugarían un papel

más importante en la obesidad de inicio en la infancia o constitucional (presenta una mayor refractariedad al tratamiento y a la pérdida de peso, con mayor tasa de patología psiquiátrica, con distribución de la grasa de forma generalizada afectando a tronco y extremidades), mientras que los factores psicológicos influirían más en la obesidad mórbida de inicio en la edad adulta (en estos casos se relaciona con situaciones de estrés, de forma que, el enfermo comería en un intento de calmar su malestar psicológico, con aumento en grasa en tronco) (27, 28).

Los pacientes con obesidad, y especialmente, los que tienen obesidad mórbida, tienen distintas alteraciones en funciones físicas corporales que limitan su calidad de vida (respiración entrecortada, trastornos del sueño, hambre patológica, deterioro de las relaciones sexuales, sudoración excesiva, incontinencia urinaria, incapacidad para el aseo personal y limitaciones en la deambulación) (23).

Los pacientes con obesidad mórbida son considerados psicológicamente diferentes, quizás porque ellos no pueden disciplinar sus hábitos alimentarios de la misma forma que el resto de la población. Aunque la existencia de la obesidad mórbida no necesariamente indica patología psiquiátrica, se considera que la existencia de determinados patrones de comportamiento y modelos de personalidad influyen en la ingesta calórica y en el gasto de la energía, y consecuentemente en la pérdida de peso (29).

Los trastornos alimentarios y conductas alimentarias anómalas son elementos comunes en los pacientes con obesidad mórbida. Se han descrito en estos enfermos una mayor tasa de trastorno por atracón (binge eating disorder), bulimia nerviosa, síndrome de ingesta nocturna (night eating syndrome), trastorno alimentario nocturno (nocturnal eating disorder), exceso de ingesta hídrica, insatisfacción corporal y comportamiento alimentarios desestructurados (30,31).

La insatisfacción corporal es uno de los malestares psicológicos más importantes en estos pacientes. Estos sujetos piensan que el resto de la gente los ve con desprecio dificultando sus relaciones interpersonales (32).

### **Fenotipo obeso metabólicamente sano.**

La obesidad se asocia con un incremento del riesgo de sufrir múltiples enfermedades, entre las que destacan las cardiovasculares. Además, la incidencia

de enfermedades cardiovasculares, de DT2, hipertensión arterial y mortalidad es superior en las personas con mayor grado de obesidad ( $IMC \geq 40$ ) (33).

Sin embargo, se ha descrito, que algunos pacientes obesos y particularmente algunos obesos mórbidos permanecen libres de complicaciones metabólicas, aunque su características antropomórficas (como el IMC) no son diferentes de aquellos obesos con complicaciones. Esta condición se ha denominado como “fenotipo obeso metabólicamente sano” (34,35).

Los obesos metabólicamente sanos (MHO *Metabolically Healthy Obese* por sus siglas en ingles) tienen niveles de HDL de al menos 40 mg/dL y no presentan DT2 ni hipertensión arterial. La frecuencia de este fenotipo aumenta en los individuos con mayor índice de masa corporal, por lo que es relativamente frecuente encontrar obesos mórbidos metabólicamente sanos (36).

Hasta hace unos años, se pensaba que la concentración sérica de la adiponectina en sangre guardaba una relación inversa con el índice de masa corporal, sin embargo, recientemente se ha reportado que la sobreexpresión del gen de la adiponectina en el tejido adiposo de los ratones ob/ob incrementa los niveles plasmáticos de adiponectina, manteniendolos en el rango fisiológico. Este cambio conlleva una importante ganancia de peso y una mejora de la hiperglucemia y otras anomalías metabólicas (37).

Aguilar Salinas et al. (36), observaron que un 20.5% de los obesos mórbidos de la muestra que analizaron eran obesos metabólicamente sanos. Este subgrupo de individuos presentaban niveles altos de adiponectina, incluso mayores que el valor medio encontrado en los individuos de peso normal. Estos individuos MHO presentaban niveles normales de glucosa, TG, insulina, proteína C reactiva y niveles altos de HDL a diferencia de aquellos individuos con el mismo IMC pero con niveles bajos de adiponectina. El trabajo concluye que los niveles altos de adiponectina aumentan la probabilidad de ser un obeso metabólicamente sano.

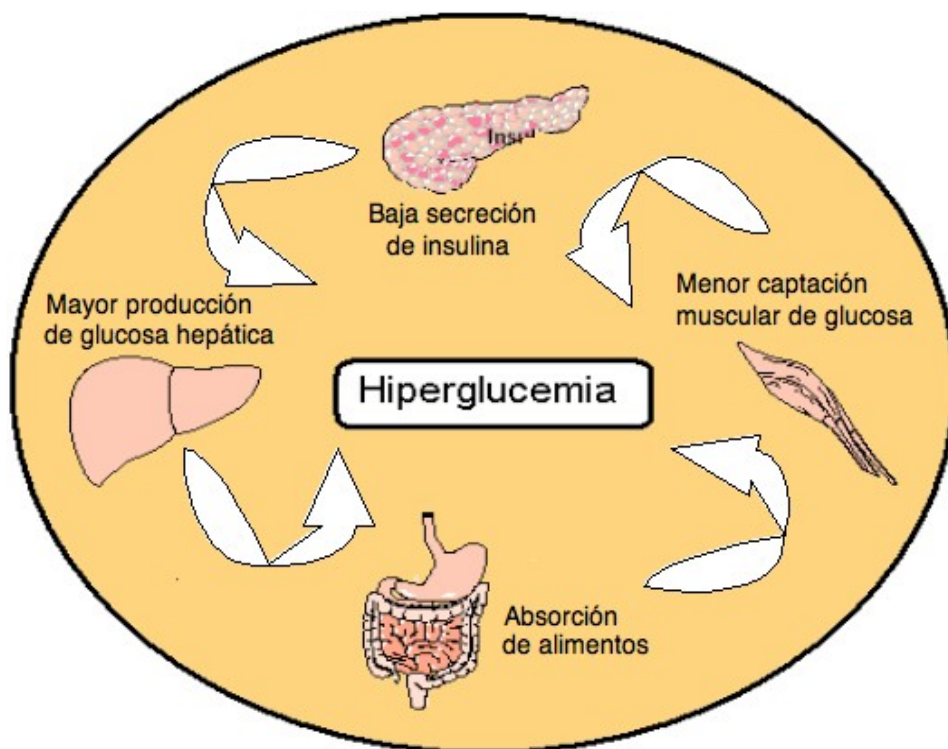
Kim et al. (37), demostraron que la expansión del adipocito inducido por la sobreexpresión del gen de adiponectina resulta en una disminución de los depósitos de lípidos ectópicos y una significativa mejora de las complicaciones asociadas con la obesidad. Este mecanismo es el que ha sido propuesto para explicar el porque los obesos metabólicamente sanos tienen esa ganancia tan dramática de peso sin

experimentar otras comorbilidades como DT2 o hipertensión. Al tener el adipocito una capacidad aumentada de almacenar lípidos y colesterol, estos no se acumulan en otras células y tejidos, y se reduce el riesgo de desarrollarse procesos de lipotoxicidad, como el que ocurre en la célula  $\beta$ , asociado con el desarrollo de DT2, o la formación de placas ateromatosas relacionadas con la hipertensión arterial (36).



## IV. Diabetes

En individuos sanos, la concentración de glucosa en plasma, es controlada por un complejo sistema cuyo regulador principal es la insulina junto con la producción de glucosa en el hígado y la captación de glucosa por el músculo y tejido adiposo. La diabetes ocurre entonces, cuando cualquiera de estos mecanismos se altera causando un aumento en la glucosa plasmática (hiperglucemia). Además de que conlleva a un daño crónico de los tejidos y un malfuncionamiento de diferentes órganos (38). La diabetes se puede clasificar en distintos grupos, de los cuales 2 son los mas importantes :



**Figura 1. Esquema que representa los factores que aumentan la concentración de glucosa en sangre, y generan hiperglucemia.**

### Diabetes tipo 1.

La diabetes tipo 1 (TD1) está caracterizada por una deficiencia absoluta en la secreción de insulina, como resultado de una destrucción autoinmune de las células  $\beta$  pancreáticas. Esta carencia de insulina endógena es la causa de hiperglucemia. Los

pacientes que la padecen, requieren de la administración de dicha hormona, por lo que se les denomina insulino-dependientes. Estos pacientes son muy propensos a la cetosis (acidosis causada por una producción excesiva de cuerpos cetónicos), además de presentar anticuerpos anti-islotos pancreáticos, los cuales pueden, al ser identificados, corroborar su diagnóstico. Los pacientes con DT1 son diagnosticados muy jóvenes (el 90% de los casos comienzan entre los 10 y 14 años de edad) por presentar síntomas agudos de la enfermedad y niveles de glucosa sanguínea muy elevados (39).

### **Diabetes tipo 2.**

El balance entre la acción de la insulina y su secreción mantienen la concentración de glucosa en sangre en un rango de 75 y 105 mg/dL. Cuando la acción de la insulina disminuye (resistencia a la insulina), la célula  $\beta$  productora de insulina es capaz de compensar con hipersecreción de la hormona. Sin embargo, la concentración de insulina podría mantenerse alta y eventualmente dañar a la célula  $\beta$  del páncreas (38). La falla en este mecanismo de compensación, causa hiperglucemia (38).

La diabetes tipo 2 (DT2) es la forma más común de diabetes. En México representa el 97% de los casos diagnosticados. Generalmente se diagnostica hasta que aparecen las complicaciones, por lo que un tercio de los afectados permanecen no diagnosticados por décadas (2).

Los pacientes pueden ser puestos en un régimen de reducción de peso y manejo de la dieta o ser tratados con medicamentos hipoglucemiantes y de forma menos frecuente, con la administración de insulina para estabilizar los niveles de glucosa en sangre (40).

Ya que muchas de las complicaciones de la diabetes se pueden desarrollar años antes de que se manifieste la enfermedad, muchos investigadores consideran que la enfermedad es parte de un grupo de factores de riesgo que predisponen a la enfermedad cardiovascular, que incluyen a la hipertensión, hiperinsulinemia, distintas dislipidemias y obesidad central (41).

La gravedad de las alteraciones varía en cada paciente, no obstante, se pueden distinguir diferencias si se clasifica bajo ciertos criterios clínicos, como lo es la edad

de aparición de la enfermedad (42). En la población mestiza mexicana, hay estudios que contemplan diferentes intervalos de edad que han demostrado las siguientes diferencias:

### **DT2 de inicio temprano.**

La padecen aquellos pacientes diagnosticados entre los 20 y 40 años de edad. La principal característica de este subtipo es la deficiencia severa en la secreción de insulina, por lo tanto, requieren de tratamiento con insulina más rápidamente. Es una forma mucho más agresiva de la enfermedad, en la que los pacientes tienen un mayor riesgo a sufrir complicaciones crónicas (43, 44).

### **DT2 de inicio tardío.**

Se da en pacientes diagnosticados después de los 40 años de edad. Su principal característica es la resistencia a la insulina. Presentan con mayor frecuencia obesidad (mayor índice de masa corporal) y dislipidemia (niveles altos de triglicéridos y colesterol LDL) al compararlos con pacientes con DT2 de inicio temprano y esto conlleva a un mayor riesgo a enfermedades cardiovasculares e hipertensión (43, 44).

### **Evaluación del modelo homeostático HOMA.**

Los índices de evaluación del modelo homeostático HOMA (*Homeostasis Model Assessment* por sus siglas en inglés) son, modelos matemáticos que permiten evaluar el grado de disfunción de la célula  $\beta$  y la resistencia a la insulina. Se calculan a partir de la concentración de glucosa e insulina en ayuno de cada paciente (45).

Los pacientes diabéticos que han desarrollado complicaciones, tales como insuficiencia renal o hipertensión y que por lo tanto, requieren de control hospitalario, comparten con los pacientes de inicio temprano una significativa disminución en los valores de HOMA  $\beta$ , que se relaciona con mayor disfunción en la secreción de insulina (43).

Este subgrupo de pacientes diabéticos tiene diferencias significativas con los pacientes de población abierta que no requiere de atención médica. Los pacientes hospitalarios presentan menor IMC, circunferencia de cintura, presión arterial, glucosa y colesterol que los pacientes de población abierta (43). Esto puede

deberse, a que los pacientes de población abierta no llevan un tratamiento especial y a que incluso, un porcentaje importante de ellos (al rededor del 35%) no saben que padecen la enfermedad (2).

### **Diabetes tipo 2 y obesidad.**

La prevalencia de DT2 aumenta en individuos obesos. La obesidad es el determinante principal de muchas enfermedades no transmisibles como la diabetes tipo 2, la hipertensión arterial, la enfermedad coronaria, la enfermedad vascular cerebral, aumenta el riesgo de varios tipos de cáncer (próstata, endometrio, mama, colón) enfermedad hepática no alcohólica, enfermedad de la vesícula biliar, afecciones músculo-esqueléticas y problemas respiratorios (12).

La obesidad es el principal factor de riesgo para DT2. Mujeres con un índice de masa corporal mayor de 30 Kg/m<sup>2</sup> tienen 28 veces más riesgo de desarrollar diabetes que las mujeres de peso normal. El riesgo para diabetes es de 93 veces más si el IMC es igual o mayor de 35 Kg/m<sup>2</sup> (46).

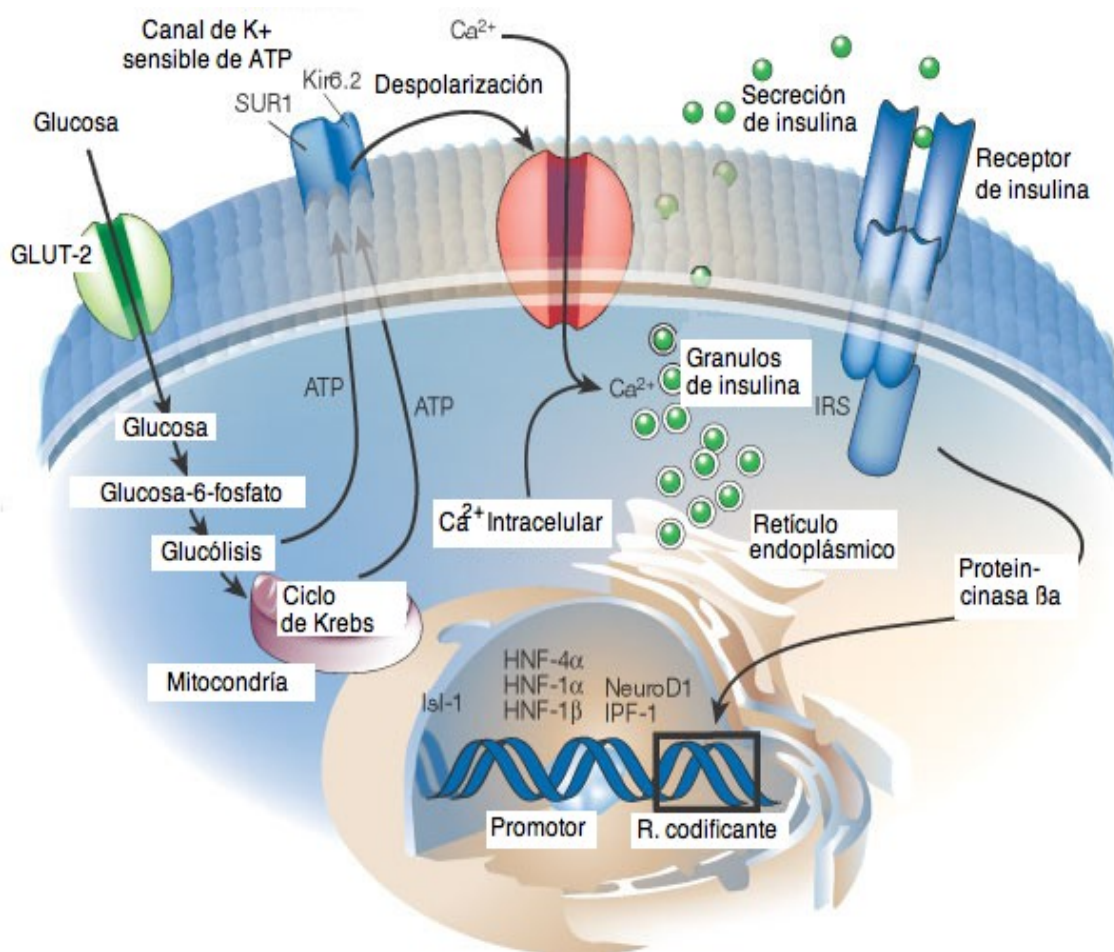
En 2007 en E.U., 11.5 millones de las mujeres con edad arriba de los 20 años (10.2%) tenían diabetes, la prevalencia era ligeramente mayor en las minorías étnicas: 10.4% en mujeres hispanicas y 11.8% en mujeres afroamericanas (47).

La ganancia de peso provoca resistencia a la insulina. Es entonces cuando la célula  $\beta$  aumenta la secreción de dicha hormona para contrarrestar el efecto de la obesidad. Por otro lado, se activa el uso preferencial de ácidos grasos como fuente de energía. Esta fase se ha denominado glucolipoadaptación. Cuando las células  $\beta$  pancreáticas no son capaces de mantener la secreción de insulina suficiente, se da el incremento de los niveles de glucosa en sangre, acompañado de cetoacidosis (por la catabolismo de ácidos grasos) y el desarrollando diabetes, fase llamada glucolipotoxicidad. Mientras permanezcan altos los niveles de triglicéridos en sangre, continuará el daño a la célula pancreática (48).

### **Síntesis, secreción y acción de la insulina.**

La insulina es una hormona sintetizada y secretada por las células  $\beta$  de los islotes pancreáticos en respuesta al incremento en la concentración de glucosa en sangre. Los efectos principales de esta hormona son: 1) supresión de la liberación de ácidos

grasos del tejido adiposo, 2) supresión de la producción endógena de glucosa hepática y la 3) incorporación de glucosa circulante en músculo (49).



**Figura 2. Secreción de insulina en la célula β pancreática.**

La glucosa es transportada al interior de la célula β pancreática por la isoforma 2 del transportador de glucosa (GLUT2). Entonces, la glucocinasa cataliza la transferencia de fosfato a partir de ATP a la glucosa, generando glucosa-6-fosfato y funcionando como un sensor de glucosa para la célula β. La generación de ATP a partir de la glucólisis y el ciclo de Krebs lleva al cierre del canal de K<sup>+</sup> sensible a ATP (KCNJ11) y se inicia la despolarización de la membrana. La despolarización de la membrana promueve la entrada de sodio y calcio. Este último, junto con el calcio almacenado en el retículo endoplásmico promueve la fusión de los gránulos de insulina con la membrana plasmática y la liberación de esta a la circulación sanguínea. La célula β pancreática tiene receptores para insulina, y esto es evidencia de la función autocrina de la insulina, lo cual incluye la transcripción de los genes de la glucocinasa y la insulina. Los genes HNF-4a, HNF-1a, HNF-1β, NeuroD1 y IPF-1 que regulan la expresión de la insulina y están implicados en el desarrollo de Diabetes tipo MODY (modificado de la ref. 49).

El incremento en la secreción de insulina después de la administración intravenosa de glucosa ocurre de forma casi instantánea. Incluso, después de la ingestión oral de glucosa, la secreción de insulina aumenta en cuestión de minutos (49).

La secreción de insulina inicia cuando la glucosa es transportada al interior de la célula  $\beta$  pancreática por la isoforma 2 del transportador de glucosa (GLUT2). Entonces, la glucocinasa cataliza la transferencia de fosfato a partir de ATP a la glucosa, generando glucosa-6-fosfato, siendo este, el primer paso limitante y funcionando como un sensor de glucosa para la célula  $\beta$ . La generación de ATP a partir de la glucólisis y el ciclo de Krebs conlleva al cierre del canal de  $K^+$  sensible a ATP (KCNJ11) y se inicia la despolarización de la membrana (49).

La despolarización de la membrana promueve la entrada de sodio y calcio al interior de la célula. Esto último junto con el calcio almacenado en el retículo endoplásmico, promueve la fusión de los gránulos de insulina con la membrana plasmática y la liberación de esta a la circulación sanguínea (49).

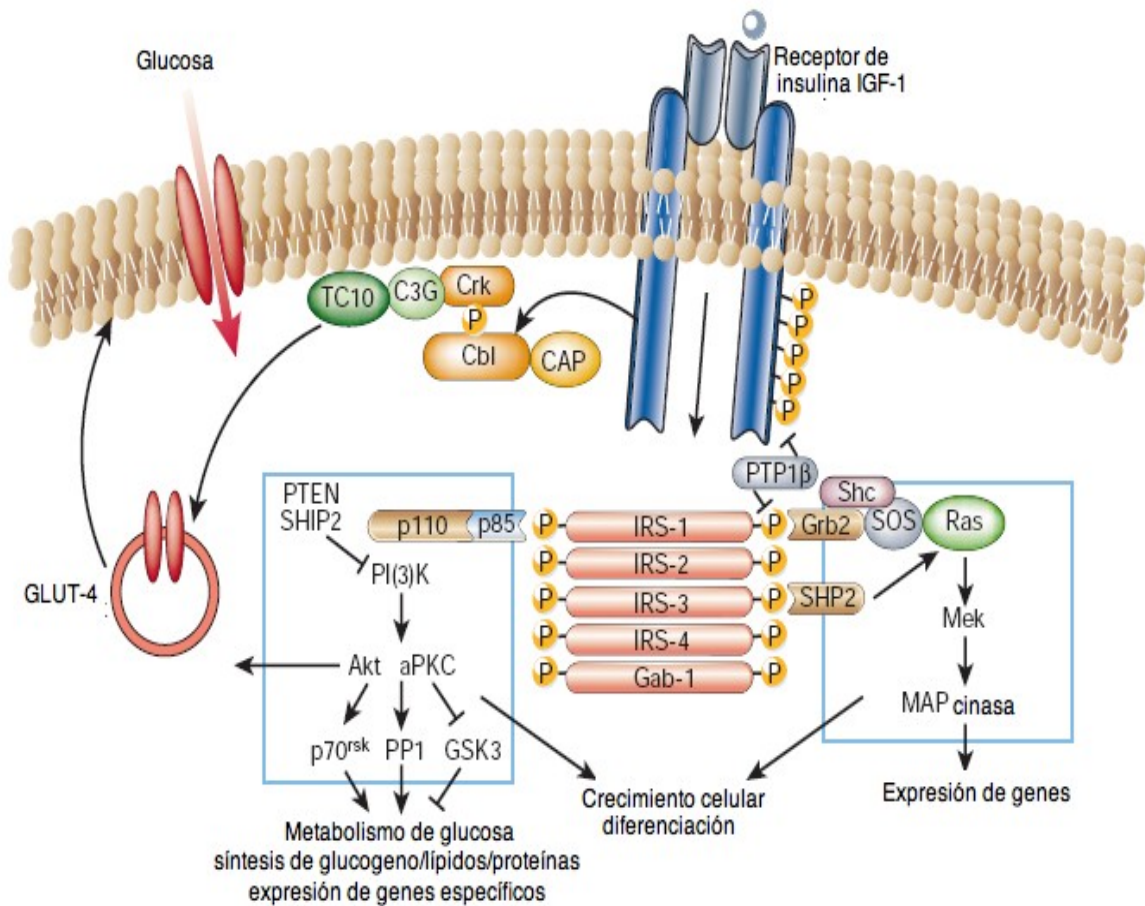
La célula  $\beta$  pancreática tiene receptores para insulina, y esto es evidencia de la función autocrina de la insulina, lo cual incluye la activación de la transcripción de los genes de la glucocinasa y la insulina. Los genes HNF-4 $\alpha$ , HNF-1 $\alpha$ , HNF- $\beta$ , NeuroD1 y IPF-1 que regulan la expresión de la insulina y están implicados en el desarrollo de diabetes tipo MODY (49).

La insulina se une a su receptor en la superficie celular, el cual pertenece a una familia de receptores de factores de crecimiento con actividad de tirosin-cinasa que comparten mecanismos de señalización intracelulares. Los dos principales mecanismos de vías de transducción de la señal de la insulina son: (a) IRS (insulina receptor substrates)/PI (phosphatidylinositol) 3-cinasa y (b) Ras/MAP cinasa (50).

Cuando la insulina se une con el receptor específico en la membrana celular, esto promueve la fosforilación de ciertas proteínas. Estas proteínas a su vez activan una cascada de fosforilación que conlleva a la movilidad de las vesículas que contienen el transportador de glucosa GLUT-4 a la membrana celular. Lo cual generan el aumento en la entrada de glucosa a la célula (50).

El transportador de glucosa dependiente de insulina GLUT-4 se expresa en el músculo esquelético, el tejido cardíaco y en el adipocito. Los ratones deficientes en

GLUT-4 (ratones knockout) presentan retardo en el crecimiento así como hipertrofia del tejido cardiaco y adiposo al nacimiento. Estos ratones además desarrollan resistencia a la insulina (50).



**Figura 3. Acción de la insulina en el tejido periférico.**

La insulina incrementa el transporte de glucosa en las células musculares y del tejido adiposo estimulando la síntesis y translocación del transportador de glucosa GLUT4 contenido en vesículas de sitios intracelulares hacia la membrana plasmática, además de inducir la expresión de una variedad de genes involucrados en el metabolismo de la glucosa y el crecimiento celular (modificado de la ref. 50).

## **V. El colesterol y la lipotoxicidad mediada por colesterol**

Tanto la obesidad, la DT2, el síndrome metabólico, la aterosclerosis etc., comparten con frecuencia un desequilibrio en los niveles plasmáticos de colesterol.

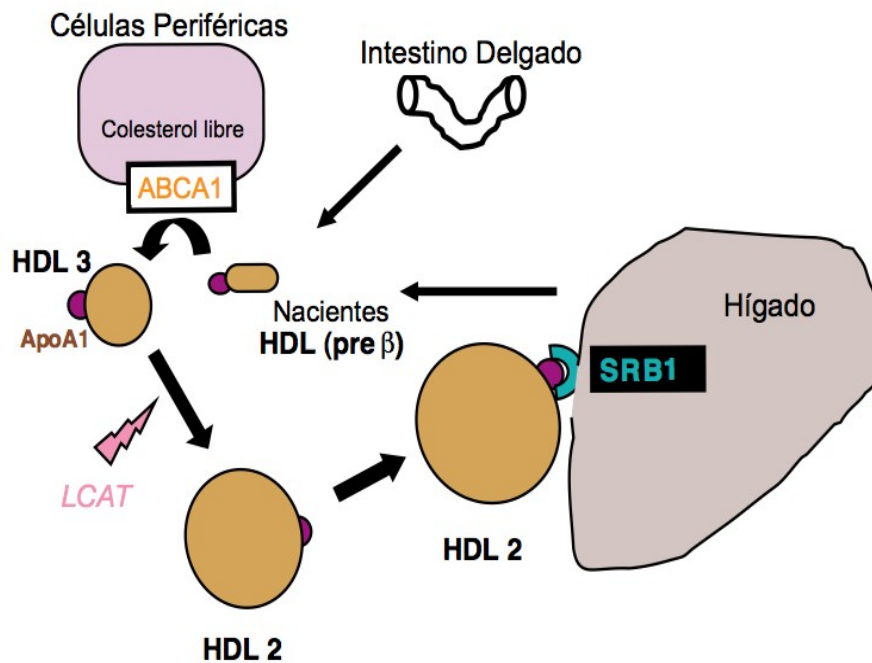
El colesterol es fundamental en la biología de las células animales. En primer lugar, el colesterol está presente en la membrana plasmática modulando su fluidez (51). El colesterol es además sustrato para la síntesis de hormonas esteroideas con múltiples funciones en el organismo y probablemente tenga muchas más funciones aun no conocidas (52).

En el organismo, aproximadamente el 66% del colesterol plasmático se encuentra unido a partículas llamadas lipoproteínas de baja densidad (LDL), cuya función es transportar el colesterol necesario para su incorporación a las membranas celulares así como para la síntesis de hormonas esteroideas. El tercio restante del colesterol plasmático se encuentra en lipoproteínas de alta densidad (HDL) cuya función más estudiada es el de transportar el exceso de colesterol desde los tejidos periféricos hacia el hígado para ser eliminado a través de la bilis. Este proceso se conoce como transporte reverso del colesterol (53,54).

### **Transporte reverso del colesterol.**

El transporte reverso del colesterol es el proceso por el cual el colesterol que se encuentra en las células periféricas es transportado hacia el hígado para su eliminación (55). El primer paso consiste en la liberación de pequeñas partículas con forma discoidal llamadas pre $\beta$ -HDL (HDL nacientes) sintetizadas en el hígado y el intestino delgado. Estas partículas de pre $\beta$ -HDL van recabando el colesterol libre de las células periféricas y su forma cambia a una estructura esférica llamada HDL-3 y posteriormente a HDL-2 en la medida en que las partículas de HDL-3 se van enriqueciendo en colesterol esterificado (vía la enzima Lecitin colesterol aciltransferasa (LCAT) asociada a las partículas de HDL nacientes) y en fosfolípidos. Finalmente, las partículas de HDL-2 son captadas por el hígado gracias al receptor basurero (scavenger) B1 (SR-B1) (56) (Figura 4).





**Figura 4. Transporte reverso del colesterol.**

El primer paso del transporte reverso del colesterol consiste en la síntesis y liberación de pequeñas partículas con forma discoidal llamadas pre $\beta$ -HDL (HDL nacientes) por el hígado y el intestino delgado. Estas partículas van recabando el colesterol libre de las células periféricas y su forma cambia a una estructura esférica llamada HDL-3 y posteriormente a HDL-2 en la medida en que las partículas de HDL-3 se van enriqueciendo en colesterol suberificado (vía la enzima Lecitina colesterol acil-transferasa (LCAT) asociada a las partículas de HDL nacientes) y en fosfolípidos. Finalmente, las partículas de HDL-2 son captadas por el hígado gracias al receptor scavenger B1 (SR-B1) (modificado de la ref. 56).

El paso determinante del proceso parece ser la salida del colesterol de la célula, para lo cual se han propuesto dos mecanismos. Uno es el eflujo de colesterol inespecífico desde la superficie celular por un intercambio fisicoquímico entre la membrana celular y las moléculasceptoras extracelulares. El otro mecanismo consiste en el eflujo de colesterol mediado por la proteína transmembranal ABCA1 (ATP-Binding Cassette Transporter A1) que inicia con la interacción de ABCA1 con la apolipoproteína A-I (apoA-I). Esta apolipoproteína funciona como aceptora del colesterol, promoviendo el eflujo de colesterol y fosfolípidos hacia las HDL nacientes (56).

Este hallazgo se derivó a partir de los datos provenientes de pacientes afectados con Síndrome de Tangier, cuyos principales rasgos metabólicos son, los niveles muy bajos de HDL y de apo-A1. En análisis de ligamiento para dicha enfermedad, se han encontrado mutaciones en el gen ABCA1 (57).

## **Lipotoxicidad por colesterol.**

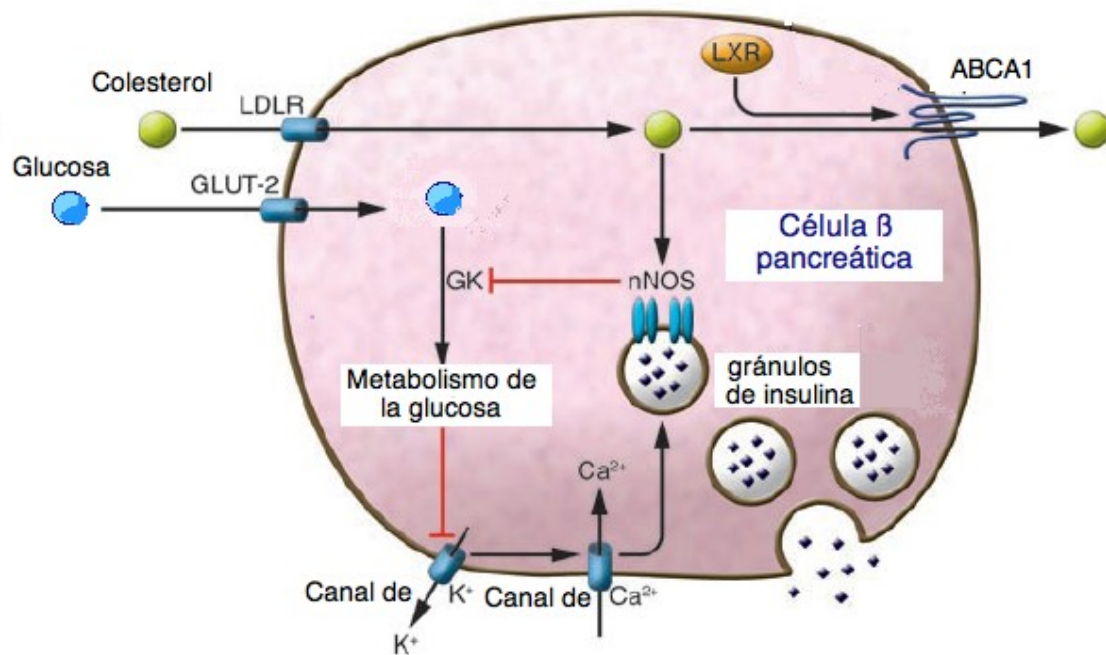
La DT2 se caracteriza por la alteración en la secreción de insulina de manera suficiente para satisfacer las demandas fisiológicas, lo cual está asociado con la resistencia periférica a la acción de la insulina y la obesidad (58).

El progreso de la DT2 involucra el deterioro de la función de la célula  $\beta$  (59). Debido a que los elevados niveles de colesterol plasmáticos son un padecimiento común en pacientes con DT2, el papel potencial del colesterol en la lipotoxicidad en los islotes pancreáticos se ha estudiado recientemente (60).

La evidencia mas directa del papel del metabolismo del colesterol en la función de la célula  $\beta$  proviene del estudio del transportador de membrana dependiente de ATP subfamilia A tipo 1 (ABCA1) (61). Los modelos animales de ratones con la delección selectiva del gen ABCA1 en la célula  $\beta$  presentan niveles normales de colesterol plasmático. Sin embargo, los islotes pancreáticos aislados de estos ratones tienen niveles de colesterol total significativamente elevados, lo que sugiere que el gen ABCA1 es esencial para el eflujo de colesterol en este tejido y por lo tanto, su disfunción resulta en la acumulación de lípidos en los islotes (62).

En la Figura 5., se representa el posible papel del gen ABCA1 y el colesterol en la función de la célula  $\beta$ . Se muestran los principales mecanismos donde el acúmulo del colesterol de los islotes podría afectar en la secreción de la insulina (figura 5).

La glucosa entra a la célula  $\beta$  a través del transportador GLUT-2, después de lo cual es fosforilada por la enzima glucocinasa (GK). El metabolismo de la glucosa tiene como resultado el cierre del canal de potasio dependiente de ATP, la despolarización de la membrana, la entrada de calcio a través del canal de calcio tipo-L y la exocitosis de los gránulos de insulina. El colesterol es captado e introducido por el receptor de LDL. El transportador ABCA1 regula el nivel del colesterol al interior de la célula. La ausencia del transportador ABCA1 en la célula  $\beta$ , incrementa el contenido intracelular de colesterol. El principal activador transcripcional de ABCA1 es el factor de transcripción LXR. La delección del gen LXR resulta en un fenotipo similar al observado en la ausencia de ABCA1 (60). Los niveles elevados de colesterol en la célula  $\beta$  probablemente afectan la secreción de insulina, promoviendo la dimerización de nNOS (*neuronal NO sintasa* por sus siglas en ingles) secuestrando a la glucocinasa, lo que afecta el metabolismo de la glucosa (63).



**Figura 5. Potencial papel del gen ABCA1 y el colesterol en la función de la célula β.**

Se presentan los principales puntos donde impacta el nivel del colesterol en la secreción de la insulina. La glucosa entra a la célula β a través del transportador GLUT-2, después de lo cual es modificada por la glucocinasa (GK). El metabolismo de la glucosa tiene como resultado el cierre del canal de K<sup>+</sup>, la despolarización de la membrana, la entrada de calcio a través del canal de calcio tipo-L y la exocitosis de los gránulos de insulina. El colesterol es captado e introducido por el receptor de LDL. El transportador ABCA1 regula el nivel del colesterol al interior de la célula. En ausencia del transportador ABCA1 en la célula β, el contenido celular de colesterol se incrementa. LXR es el principal activador transcripcional de ABCA1, la delección del gen LXR resulta en un fenotipo similar al observado en ausencia de ABCA1. Los niveles elevados de colesterol en la célula β perjudican la secreción de insulina promoviendo la dimerización de nNOS, desregulando a GK, lo que afecta el metabolismo de la glucosa. Es posible que el colesterol también inhiba otros pasos en la exocitosis de la insulina (modificado de la ref. 60).

Es posible que el colesterol inhiba también, otros pasos en la exocitosis de la insulina. El colesterol es un componente de la membrana y de los gránulos de secreción de la insulina, además, los microdominios ricos en colesterol (lipid rafts) ubicados en la membrana plasmática, son esenciales para la exocitosis (64). Esto ha llevado a proponer que el colesterol tiene un papel crítico en la fusión de los gránulos de insulina. El exceso de colesterol (por ejemplo, en ausencia del transportador ABCA1) causa la alteración de las lipid rafts, alterando con ello la exocitosis (60).

## **VI. Gen ABCA1**

El gen ABCA1 es responsable de la enfermedad de Tangier, una entidad autosómica recesiva poco frecuente que cursa con niveles muy bajos de HDL-C, formación de depósitos de colesterol en macrófagos tisulares y en otros tejidos, así como un riesgo alto de enfermedad coronaria por aterosclerosis (65).

ABCA1 se expresa en una gran variedad de tejidos, en donde podría tener muy diversas funciones que aún se desconocen. La función más conocida de ABCA1 es la de promover el eflujo de colesterol y fosfolípidos a través de membranas, así como la formación de partículas de HDL (66).

Recientemente se ha encontrado evidencia de que ABCA1 participa en otros procesos muy diferentes como la endocitosis, la apoptosis, el tráfico vesicular y en otros mecanismos como la exocitosis de proteínas que carecen de secuencia señal en el extremo amino (67,68).

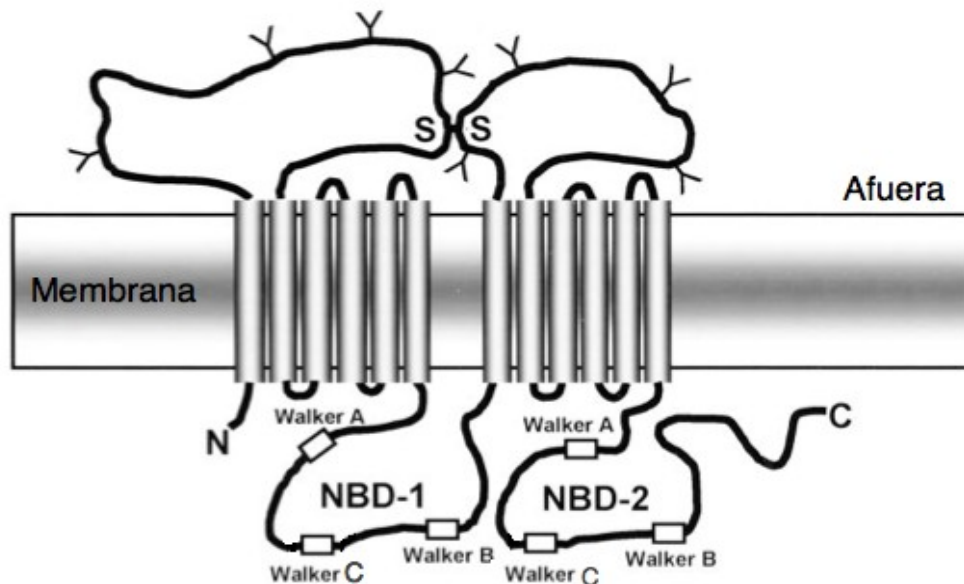
### **Estructura del gen.**

El gen ABCA1 se localiza en el brazo largo del cromosoma 9 (9q31.1) y está compuesto por 146,581 pb, consta de 50 exones y 49 intrones. El exón 1 codifica parte de la región no traducida 5' (UTR) y le sigue un largo intrón de 24156 pb. El exón 2 codifica el resto del UTR 5', el codón de inicio para metionina y los primeros 21 residuos de la región amino-terminal de la proteína de ABCA1. Con excepción del exón 50 con 3454 pb, el tamaño de los exones es relativamente pequeño, con un rango que va de 33 a 245 pb, mientras que el rango de tamaño de los intrones va de 111 a 24156 pb (69). Se han identificado 62 elementos Alu en las 147 kb del gen de ABCA1 humano, la mayoría (14 elementos) localizadas en el intrón 1. Se ha identificado un elemento HERV en el intrón 5 (69).

### **Estructura de la proteína.**

El gen ABCA1 codifica para una proteína de membrana dependiente de ATP de 2261 aminoácidos, cuya función principal es el transporte de colesterol y fosfolípidos a través de la membrana plasmática hacia lipoproteínas de bajo o nulo contenido lipídico (partículas de HDL nacientes) (70). La proteína consta de 2 subunidades con

estructura similar (71). Cada una con un dominio transmembranal con seis hélices y un dominio de unión a nucleótidos que contiene 2 regiones peptídicas Walker A y Walker B, conservadas en muchas proteínas que utilizan ATP, además de una región Walker C que es propia de las proteínas ABC (Figura 6) (71).



**Figura 6. Estructura del transportador dependiente de ATP, Subfamilia A, tipo 1 (ABCA1).**

El gen ABCA1 codifica para una proteína de membrana dependiente de ATP de 2261 aminoácidos, cuya función principal es el transporte de colesterol y fosfolípidos a través de la membrana plasmática hacia apolipoproteínas de bajo o nulo contenido lipídico. Esta formada por 2 subunidades con estructura similar. Cada mitad contiene un dominio transmembranal con seis hélices y un dominio de unión a nucleótidos (NBD *nucleotide binding domain*) que contiene 2 regiones peptídicas Walker A y Walker B, conservadas en muchas proteínas que utilizan ATP, además de una región Walker C que es propia de las proteínas ABC (modificado de la ref. 70).

El extremo amino está orientado hacia el citosol. Existen 2 asas extra-celulares grandes, altamente glicosiladas, unidas entre sí por uno o más enlaces entre los residuos de cisteína (72).

En la célula, la proteína ABCA1 se encuentra predominantemente en forma de homodímeros ensamblados en el retículo endoplásmico, en los que los extremos C se encuentran muy próximos (73). Estas estructuras diméricas pueden transformarse a estructuras de mayor orden como tetrámeros durante el ciclo catalítico de ATP de

la proteína. Se ha sugerido que los tetrámeros de ABCA1 son la estructura funcional mínima requerida para la lipidación de las partículas de apoA1 (74).

### **Regulación de la expresión del gen.**

La secuencia del promotor de ABCA1 humano contiene varios sitios de unión para factores de transcripción. Los primeros 250 pb del promotor de ABCA1 son ricos en G y C (contenido GC superior al 62%). Se identificó también una caja TATA (TCTATAAAAG) 33 pb aguas arriba del sitio de inicio de la transcripción (69).

La expresión del gen ABCA1 es tejido-específico. La expresión de ABCA1 está regulada por una red transcripcional altamente sofisticada, mediada por diversos factores de transcripción como PPAR (peroxisome proliferator-activated receptors), los receptores nucleares hepáticos (LXR $\alpha$  y LXR $\beta$ ) y el receptor nucleolar retinoide (RXR) (75).

Una sobrecarga de colesterol en la célula induce la transcripción de ABCA1 mediante la activación de LXR $\alpha$  y LXR $\beta$  y el receptor nucleolar retinoide (RXR). Los factores de transcripción LXR y RXR forman heterodímeros obligados que se unen preferentemente a elementos de respuesta localizados en el promotor y el primer intrón de ABCA1. Los oxisteroles y el ácido retinoico se unen a LXR y RXR respectivamente. la unión de uno o ambos ligandos puede activar la transcripción del gen (76).

En ausencia de inductores de ABCA1 y de apolipoproteínas, el mRNA y la proteína son rápidamente degradados (77). Existen muchos factores metabólicos que modulan la velocidad de degradación de la proteína, ya sea por el sistema de calpaínas o por otros procesos. La interacción con apolipoproteínas retrasa dramáticamente la velocidad de degradación de ABCA1 (78).

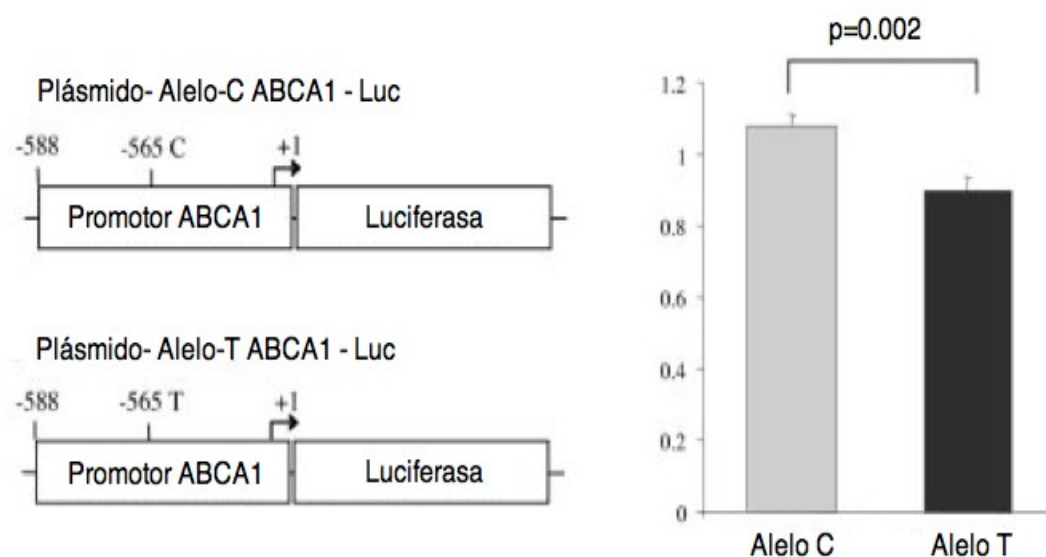
### **Variabilidad del gen ABCA1.**

Muchos factores influyen en la modulación de los niveles de HDL-C, los cuales se incluyen el consumo de tabaco, el consumo de alcohol y la actividad física (79). Además, se ha descrito el efecto de diversas mutaciones del gen ABCA1 como moduladores de los niveles de colesterol HDL en plasma. En dos estudios extensos, se encontró que entre el 10 y el 16% de los individuos con HDL bajo presentan

mutaciones en ABCA1 (80).

El SNP -14C>T del promotor y la variante R1587K de ABCA1 se han asociado con niveles bajos de HDL (81,82), mientras que las variantes no sinónimas V771M, V825I y I883M de ABCA1 se han asociado con elevados niveles de HDL (83,84).

En dos estudios, se analizaron los efectos funcionales de diferentes SNPs *in vitro* (85,86), demostrando que, las variantes I883M y S1731C disminuyen significativamente el eflujo de colesterol, mientras que los SNPs V771M y V825I parecen incrementarlo.



**Figura 7. Actividad *in vitro* de la variante -565C>T del promotor del gen ABCA1**

En 2005, Kyriakou et al. (91) encontraron asociación entre el SNP -565 C>T y el desarrollo de aterosclerosis severa, además de una menor expresión del gen asociada al alelo T.

A la izquierda se encuentra la representación esquemática de los plásmidos construidos con 588 pb del promotor de ABCA1 y la región codificante del gen reportero luciferasa, cada uno con el alelo C o T en la posición -565, respectivamente. A la derecha se presenta la actividad de la luciferasa en macrófagos transfectados con el plásmido del promotor ABCA1. Se observaron diferencias significativas entre los plásmidos de distintos alelos (modificado de la ref. 91).

La variante R230C se describió inicialmente como un polimorfismo causal de hipo-alfa-lipoproteinemia familiar (87). Más recientemente, la variante R230C se asoció con una disminución de los niveles de HDL y ApoA1 en la población mestiza mexicana (88). Los genotipos R230C/C230C fueron significativamente más frecuentes en el grupo con HDL bajo que en el grupo con HDL alto (89). El

polimorfismo R230C de ABCA1 se ha asociado también con obesidad y con DT2, en particular, con diabetes de inicio temprano (90).

Se han estudiado también, distintos polimorfismos que afectan la acción del promotor de ABCA1, como es el caso del polimorfismo -565C>T (rs2422493). En 2005, Kyriakou et al. (91), encontraron asociación entre el SNP -565 C>T con el desarrollo de aterosclerosis severa y con una menor expresión del gen asociada al alelo T y además con una reducción, aunque marginal, de los niveles de HDL.



## VII. Estrategias de estudio del componente genético de la obesidad y la DT2

Existen estudios en familias, gemelos y de adopción que apoyan un importante componente genético en la obesidad. (92,93) Estos estudios han establecido que la obesidad es altamente heredable, y que el riesgo individual de ser obeso se incrementa cuando uno de los padres lo es (94). Algunos estudios han informado que los niños obesos frecuentemente tuvieron padres obesos. En el 30% de los casos de niños obesos, ambos padres son obesos (94).

Los análisis de segregación familiar han demostrado que la mayoría de las familias con DT2 presentan un patrón de herencia donde los descendientes en primer grado tienen un mayor riesgo de desarrollar la enfermedad con respecto al riesgo la población general. El riesgo aumenta dramáticamente cuando ambos padres la padecen (38).

La obesidad es un ejemplo importante de un fenotipo complejo, en el cual, el rasgo surge como resultado de interacciones entre múltiples genes, así como factores conductuales y ambientales (95). Los factores ambientales juegan un papel desencadenando la enfermedad al existir factores genéticos de riesgo. Por su parte, las variantes de riesgo para DT2 en una determinada población pueden no serlo para una población distinta. El estudio de las regiones cromosómicas identificadas como *loci* de susceptibilidad para DT2 en la población caucásica y asiática ha demostrado que, aunque clínicamente la DT2 aparenta ser una solo entidad, es de hecho, un grupo de enfermedades con diferentes causas genéticas (7).

En 1962, Neel (96) propuso la hipótesis del gen ahorrador, en ella plantea que, ciertas poblaciones descendientes de antiguos cazadores y recolectores tienen rasgos genéticos que alguna vez confirieron ventajas, ya que promovían el almacenamiento de calorías en forma de grasa y otros mecanismos que mejoraban la eficiencia metabólica, los cuales permitían su supervivencia en tiempos de escasez de alimento. Pero en la actualidad, donde las provisiones de alimentos son abundantes y la actividad física es mínima, esos mismos rasgos se han vuelto perjudiciales.

Existen diferentes estrategias para localizar la región cromosómica y los genes responsables de la enfermedad, entre los que se encuentran las siguientes.

### **Análisis de ligamiento.**

Se realizan en familias o en pares de hermanos afectados con la enfermedad, con la idea de que comparten regiones genómicas no al azar y el propósito es identificarlas, ya que en estas regiones compartidas pueden encontrarse las variantes genéticas que favorecen el desarrollo de la enfermedad. Esta estrategia sin embargo, presenta dos desventajas: tiene poco poder estadístico, lo que dificulta la detección de efectos modestos y en segundo lugar, la resolución del mapeo es muy baja por lo que, aun cuando se ha identificado la región, detectar el gen específico resulta muy complicado (97).

### **Análisis de asociación. Análisis de genes candidatos.**

Existen genes de los cuales se tiene sospecha de su contribución a la enfermedad, ya sea por que participan en las vías metabólicas relacionadas o bien, por que se cuenta con información derivada de modelos animales en los que la alteración algún gen, aumenta el riesgo de desarrollar la enfermedad. En los estudios de asociación el propósito es identificar uno o más alelos o haplotipos (conjunto de polimorfismos) que sean más frecuentes entre el grupo de pacientes con respecto a un grupo de controles. Esto es, en estos estudios se compara la frecuencia de distintas variables genéticas entre individuos afectados y no afectados (diseño caso-control) (97).

Los polimorfismos son responsables de la mayoría de la variabilidad fenotípica en los seres humanos. Una variante se considera polimórfica si su frecuencia es mayor al 1% en la población general (98).

Las variantes más abundantes en el genoma son los polimorfismos de un solo nucleótido (SNP *single nucleotide polymorphisms* por sus siglas en inglés), donde se presenta un cambio de una base por otra en el mismo locus (sitio fijo en el genoma), lo cual las convierte en variantes dialélicas (dos alelos) y facilita su estudio (98).

Si el SNP se localiza en la región codificante, puede producir un cambio en un aminoácido dentro de la proteína (mutación no-sinónima) lo cual puede modificar su actividad o su función. Sin embargo, los SNP's también pueden modificar la

expresión (transcripción) del gen, si el cambio ocurre en la región promotora. Aunque los intrones no se traducen en la proteína, cambios en estas regiones pueden modificar también la expresión del gen (98).

las variantes genéticas en los genes codificantes de las moléculas responsables de la regulación de la energía han sido seleccionados con posibles candidatos como responsables del desarrollo de la obesidad (99).

En el caso de la obesidad, el estudio de genes candidatos seleccionados por estar involucrados en la regulación de la homeostasis de energía y composición corporal, ha permitido asociar variantes comunes, sin embargo estas variantes tienen solo efectos modestos (99). En algunos casos. La posición de estos genes coincide con regiones cromosómicas previamente delimitadas en estudios de ligamiento, lo que reforzaría su posible participación como genes de susceptibilidad para la obesidad (100).

En los pasados 10 a 15 años se demostró que, mutaciones en genes como el gen de la leptina (LEP), receptor de leptina (LEPR), la pro-hormona convertasa 1 (PC1) y el gen de pro-opiomelanocortina (POMC) son responsables de las formas autosómicas recesivas de obesidad extrema de inicio temprano (101). Estas mutaciones son muy raras, y además de su asociación con obesidad extrema, conllevan a manifestaciones fenotípicas adicionales, que incluyen pelo pelirrojo (POMC), baja fertilidad o infertilidad (PC1, leptina y LEPR), insuficiencia suprarrenal (POMC) y deficiencia inmunitaria (LEP) (102, 103, 104).

Entre estos genes se encuentran también los receptores de melano-cortina 3 y 4 (MC3R y MC4R). Se han estudiado estos genes por su localización en el hipotálamo y por su papel en la vía de señalización de la leptina (105). Se han descrito en humanos, varias mutaciones en el gen de MC4R, y se asociaron con el fenotipo obeso, especialmente con la obesidad de inicio temprano (106). La variante I335S de MC3R resulta en la pérdida completa de función del receptor y aparenta llevar a una ausencia de expresión en la superficie celular (107).

### **Análisis de asociación. Análisis de asociación del genoma completo.**

Otra estrategia desarrollada para el estudio de enfermedades complejas son los estudios de asociación del genoma completo (GWAS *Genome Wide Association*

*Studies* por sus siglas en inglés). En este tipo de estudio, la posibilidad de detectar asociación no está restringida a una sola región cromosómica ya que se pueden analizar simultáneamente cientos de miles de marcadores polimórficos (de 100 mil a 500 mil) localizados a lo largo de todo el genoma en un mismo experimento. Ya que no se tiene ninguna hipótesis previa sobre la participación de algún gen en particular, los estudios GWAS permiten detectar asociaciones nuevas y muchas veces, inesperadas (108).

En el año 2007, se publicaron los primeros análisis tipo GWAS para la diabetes tipo 2 y obesidad. Una de las primeras asociaciones publicadas fue el SNP en el primer intron del gen llamado FTO (109,110,111). Este SNP fue fuertemente asociado con diabetes tipo 2, pero esta asociación se perdió cuando se ajustó por IMC (110). Por lo tanto, El *locus* de FTO está asociado principalmente con la obesidad tanto en niños como en adultos y consecuentemente incrementa el riesgo a diabetes tipo 2 (109,110).

Se ha documentado que los estudios GWAS para la obesidad y el índice de masa corporal son una poderosa herramienta para detectar variantes genéticas relevantes para estos fenotipos. Se han identificado variantes en genes independientes con un efecto pequeño sobre el peso corporal, sin presentarse ambigüedad en 17 regiones genéticas hasta la fecha (112).

Se ha reportado una variante de alta penetrancia en obesidad, inicialmente observada en 31 sujetos que eran heterocigotos para una delección de al menos 593 Kb en el cromosoma 16p11.2 y que incluye deficiencias cognitivas. 19 delecciones similares se identificaron a partir de los datos de GWAS en 16,053 individuos de 8 cohorte europeos. Estas delecciones estaban ausentes en los controles no obesos y representaba el 0.7% de los casos de obesos mórbidos (113).

Los SNPs han sido de gran utilidad para el análisis masivo de polimorfismos en diferentes genes candidatos, en búsqueda de asociaciones con DT2. En dos distintos trabajos en donde se utilizó esta estrategia, uno de ellos analizó 398 SNPs de 120 genes candidatos en la población japonesa, mientras el otro analizó 152 SNPs en 71 genes candidatos en individuos caucásicos. Ambos estudios encontraron que la DT2 estaba asociada a un número pequeño de genes, algunos

de ellos involucrados en el funcionamiento de la célula  $\beta$ , tales como HNF-4 $\alpha$  o GLUT-2 (SLC "A") y otros involucrados en la acción de la insulina como el gen del receptor de la insulina (114).

Por otra parte, por medio de los estudios de ligamiento del genoma completo se demostró la presencia de diferentes *loci* de susceptibilidad a DT2 en diversos grupos étnicos. El mapeo de genes ha permitido identificar más de 30 regiones cromosómicas que contienen una o más genes de susceptibilidad para la DT2. Por ejemplo, en la población México-americana se detectaron señales positivas en los cromosomas 2, 3, 4, 9, 10 y 15 (115). Una vez que una región cromosómica de susceptibilidad ha sido identificada, el siguiente paso es encontrar el gen o genes relacionados con la enfermedad contenidos en esa región. Esta es una tarea laboriosa y hasta la fecha, ha permitido identificar solo el gen de la calpaina-10 y el gen del factor de transcripción TCF7L2 como importantes genes de susceptibilidad a DT2 en la población México-americana y en la población europea respectivamente (115).

### **Definición de las causas genéticas de DT2 y obesidad en la población mexicana.**

Al momento de su identificación, la función del gen FTO era desconocida y por lo tanto, hubo mucho interés en determinar si FTO era el gen causante fundamental de obesidad (116). En la actualidad, se sabe que FTO codifica para una desmetilasa dependiente de 2-oxoglutarato de ácidos nucleicos (117). El gen FTO humano es ampliamente expresado tanto en el tejido fetal y el tejido adulto incluyendo el tejido adiposo, donde los niveles más altos relativos se han encontrado en el cerebro y en los islotes pancreáticos (110), sin embargo el papel de FTO en la obesidad sigue siendo materia de estudio (118).

Se ha observado que los polimorfismos de FTO confieren una asociación altamente significativa con la obesidad particularmente con el tipo III, sugiriendo que FTO es uno de los principales genes de susceptibilidad para la obesidad mórbida en la población mexicana (118).

Se han buscado asociaciones con las variantes de FTO con varios parámetros metabólicos por varios autores con resultados inconsistentes. En una muestra grande de individuos caucásicos, Freathy et al. (119) encontraron asociación entre el

alelo A del SNP rs9939609 de FTO con insulina aumentada, glucosa y triglicéridos elevados, y con niveles bajos de HDL. Sin embargo, no se observaron asociaciones cuando se hace el ajuste por IMC.

En México se encontró que el gen FTO es un factor de riesgo para obesidad (particularmente con obesidad clase III) en la población mestizo mexicana y con una sobrerregulación en el tejido adiposo subcutáneo en individuos en los obesos clase III (118).

A la fecha se han obtenido asociaciones positivas en los genes TCF7L2 rs12255372 (120) y ABCA1 rs9282541 [R230C] (89) en la población mestiza mexicana.

Por su parte, el polimorfismo R230C del gen ABCA1, un cambio de una arginina por una cisteína, se ha asociado con niveles bajos de colesterol HDL y con un incremento en el índice de masa corporal y obesidad (89). El polimorfismo además, está significativamente asociado con el síndrome metabólico y en una muestra específica, individuos con el alelo C230 tiene 4.5 veces de incremento en el riesgo para DT2, el riesgo se mantuvo significativo aun después de ajustar por colesterol HDL, IMC, nivel de apoA-1 y ancestría. En 2 grupos adicionales de individuos mexicanos, se encontró que el polimorfismo R230C de ABCA1 está en asociación significativa con DT2, en particular con diabetes tipo 2 de inicio temprano (90).

La alta prevalencia de diabetes en México sugiere que la población mexicana presenta una alta susceptibilidad a desarrollar la enfermedad. La influencia de los factores ambientales tales como el cambio en el estilo de vida y la migración de zonas rurales hacia áreas urbanas así como la adquisición de hábitos alimenticios mas occidentales han incrementado el riesgo de adquirir diabetes en México (115).

Se ha analizado la participación de genes antes asociados con diabetes tipo MODY en un grupo de pacientes mexicanos con DT2, encontrando que estos genes solo explican el 10% de los casos de diabetes de inicio temprano en está población, además del polimorfismo de alto riesgo para esta población del gen de calpaina-10. También han encontrado evidencia de la presencia de dos genes de susceptibilidad más. Se ha identificado un haplotipo de 3 SNPs en el exón 7 del gen HNF-1a en pacientes con diabetes de inicio temprano y han encontrado que el polimorfismo P12A del gen PPAR- $\gamma$  tiene asociación con el desarrollo de DT2 y nefropatía (115).

## VIII. Justificación

La obesidad ha sido considerada desde 1998 como una epidemia mundial debido a que existen más de 1 billón de adultos con sobrepeso y por lo menos 300 millones de éstos son obesos (1).

La prevalencia de la obesidad clínicamente severa (obesidad mórbida) esta incrementándose mas rápidamente que la obesidad no mórbida (26).

En México, la prevalencia de la obesidad mórbida en mujeres aumentó en un 48% (de 2.5% en el año 2000 a un 3.7% en el 2006). En este mismo periodo de tiempo, en hombres, la prevalencia de obesidad mórbida fue aumentando, pero fue menor que aquella observada en mujeres (de 0.9% a 1.1%) (26).

Por su parte, la prevalencia de diabetes en México se ha incrementado al menos 10 veces en los últimos 25 años y la obesidad es considerada el principal factor de riesgo para desarrollar DT2 (5).

El transportador ABCA1 es el principal mediador en el proceso de transporte reverso del colesterol, en el cual, el colesterol de las células periféricas es transportado hacia el hígado para su eliminación (67).

Los niveles bajos de colesterol HDL se han asociado con el desarrollo de obesidad y de enfermedad coronaria, además, la acumulación crónica de colesterol al interior de la célula  $\beta$  y el fenómeno de lipotoxicidad por colesterol se han relacionado con la patogénesis de la DT2 (91).

En 2005, Kyriakou et al. (91), encontraron asociación entre el SNP -565C>T de ABCA1 con el desarrollo de aterosclerosis severa, además describieron el efecto funcional de esta variante del promotor, en donde la presencia del alelo T se asoció con menor expresión del gen.

En la población mexicana, se reportó la asociación del polimorfismo R230C de ABCA1 con obesidad y con DT2 de inicio temprano (88,90) así como con niveles bajos de colesterol HDL en la población mexicana (89). Sin embargo, para el SNP -565C>T de ABCA1 se desconoce su frecuencia en la población mestiza mexicana, además de sus posibles asociaciones a distintos rasgos metabólicos y fenotipos clínicos.

Considerando que este polimorfismo es común en otras poblaciones y que se ha relacionado a la disminución en la expresión del gen ABCA1, es posible que participe en el desarrollo de la obesidad, la diabetes tipo 2 y la disminución en los niveles de HDL, entre otros rasgos metabólicos, en sujetos de población de la mexicana. Por lo tanto, este proyecto nos propusimos determinar la frecuencia de esta variante en una muestra de población abierta, describir su posible asociación a distintos rasgos como la obesidad y la obesidad mórbida en grupos de sujetos caso/control, además de describir la frecuencia de la variante en subgrupos bien determinados de pacientes con DT2.

## **IX. Hipótesis**

Considerando que existen variantes genéticas que afectan la función de la proteína ABCA1 y que han sido previamente asociadas con el desarrollo de la obesidad, la DT2 y con niveles bajos de HDL en la población mestiza mexicana, es posible que la variante -565C>T del promotor de ABCA1, que resulta en la disminución en la expresión del gen, también pudiera asociarse con algunos de estos rasgos en la población mexicana.



## X. Objetivos

1. Determinar las frecuencias alélicas y genotípicas del polimorfismo -565C>T de ABCA1 en una muestra de sujetos mestizos mexicanos de la población abierta.
2. Determinar y comparar las frecuencias alélicas y genotípicas del polimorfismo -565C>T de ABCA1 en sujetos obesos y sujetos delgados.
3. Determinar y comparar las frecuencias alélicas y genotípicas del polimorfismo -565C>T de ABCA1 entre sujetos obesos con y sin obesidad mórbida.
4. Determinar y comparar las frecuencias alélicas y genotípicas de este polimorfismo entre obesos mórbidos metabólicamente sanos y no-metabólicamente sanos.
5. Determinar y comparar las frecuencias alélicas y genotípicas de este polimorfismo en subgrupos bien caracterizados de pacientes con DT2.
6. Estudiar el potencial efecto de la variante -565C>T de ABCA1 sobre los niveles plasmáticos de HDL-C y otras variables de interés como colesterol total, LDL y glucosa en los distintos grupos de sujetos delgados, obesos y obesos mórbidos.

## **XI. Diseño experimental y metodología.**

Una variable alélica se define como un cambio en la secuencia del DNA que puede o no tener un efecto funcional. Esto es, generar cambios en la función de la proteína para la cual codifican, o bien, afectar la actividad transcripcional o el precesamiento del mRNA.

Las variantes de secuencia asociadas a distintos rasgos fenotípicos o patológicos (variantes de riesgo) pueden tener o no efecto funcional. Es decir, puede existir asociación a una o más variantes genéticas en un determinado *locus*, por encontrarse cercanas entre sí. Entonces decimos que se encuentran en desequilibrio de ligamiento, es decir que siempre se heredan juntas ya que por su cercanía física es poco probable que existan eventos de recombinación.

Los individuos que tengan un alelo con la variante de riesgo en ambos cromosomas homólogos, se llamarán homocigotos para el alelo de riesgo. Aquellos que solo tengan el alelo con la variante de riesgo en uno de los cromosomas, serán llamados heterocigotos para el alelo de riesgo. Por su parte, los individuos que no tiene ninguno de los cromosomas con la variante de riesgo se les denomina, homocigoto común. En ocasiones, el efecto de la mutación es muy discreto, y/o su frecuencia en la población es muy baja, por lo que una muestra pequeña puede no ser suficiente para evidenciar asociación.

### **Población abierta.**

En este trabajo se propuso describir las frecuencias alélicas y genotípicas del SNP -565C>T de ABCA1 en individuos mestizos mexicanos de la población abierta, para lo cual se analizaron individuos captados a través de la Encuesta Nacional de Salud (ENSA) realizada en el año 2000.

Brevemente, la ENSA 2000 se trató de un estudio de población abierta que incluyó hombres y mujeres provenientes de 400 ciudades y municipios de toda la república. La muestra fue representativa de la población mexicana la en cuanto a distribución geográfica, de edad y de género. Los datos demográficos y el historial médico fueron recabados por medio de un cuestionario estandarizado.

Para propósitos de este estudio, se incluyeron únicamente muestras de individuos que presentaron entre 9 y 12 horas de ayudo. Se estudiaron 100 individuos, 50 hombres y 50 mujeres seleccionados al azar, sin que hubiera sesgo de educación, edad, nivel socioeconómico o la región de procedencia.

### **Población caso-control para el estudio de obesidad.**

Los sujetos fueron captados a través del departamento de Endocrinología y metabolismo del Instituto Nacional de Ciencias Médicas y Nutrición Salvador Zubirán (INCMNSZ) como parte de un protocolo cuyo objetivo es identificar la participación de distintos genes en la fisiopatología de la obesidad. Los criterios de inclusión se presentan en la Tabla 2:

**Tabla 2.** Criterios de inclusión para el estudio de asociación caso-control para obesidad.

<b>Obesos</b>	<b>Delgados</b>
Sujetos con obesidad, diagnosticados por un IMC $\geq 30$ Kg/m <sup>2</sup> y $< 40$ Kg/m <sup>2</sup> .	Sujetos delgados, clasificados por presentar un IMC $\geq 18.5$ Kg/m <sup>2</sup> y $< 25$ Kg/m <sup>2</sup> .
Edad entre 30 y 60 años.	Edad entre 30 y 60 años.
Sujetos no relacionados (sin parentesco).	Sujetos no relacionados (sin parentesco).
Mexicanos de al menos 3 generaciones.	Mexicanos de al menos 3 generaciones.

Criterios de exclusión:

1. Sujetos con diagnóstico confirmado de DT2 al inicio del estudio.
2. Sujetos que estén recibiendo terapia hormonal con estrógenos, progestágenos o mezcla.
3. Sujetos que se encuentren recibiendo tratamiento para la obesidad al inicio del estudio, ya sea de tipo farmacológico (sibutramina, orlistat, anfetaminas, anorexigénicos, diuréticos) y/o regimen de dieta con un nutriólogo y/o que realice más de 3 horas de ejercicio en 3 o más secciones semanas.
4. Sujetos con patologías que causen edema (cirrosis hepática, insuficiencia cardiaca congestiva, insuficiencia renal crónica).
5. Sujetos con síndromes hereditarios que incluyan la obesidad como uno de sus rasgos fenóticos: pseudohipoparatiroidismo, Prader-Willi, PW-like, Borjeson-

Forssman-Lehman, Bardet-Biedl, Angelman, Síndrome de Alstrom, y Wilson-Turner.

6. Sujetos cuyo cuestionario tenga escasa información o que no haya firmado el consentimiento informado.

### **Población de sujetos con obesidad mórbida.**

Se incluyeron individuos obesos mórbidos, los cuales acudieron al INCMNSZ para recibir tratamiento para su obesidad. Estos individuos fueron reclutados tomando como único criterio un índice de masa corporal mayor a 40 Kg/m<sup>2</sup>. Solo se incluyeron en el estudio a aquellos individuos que no hubieran desarrollado DT2 al inicio del estudio.

Para fines de análisis, los obesos mórbidos fueron divididos en dos subgrupos dependiendo si cumplían con las características establecidas para el fenotipo de obeso metabólicamente sano (MHO por sus siglas en inglés, *Metabolically Healthy Obese*), siendo aquellos individuos que, a pesar de tener un índice de masa corporal superior a 40 Kg/m<sup>2</sup> tienen niveles saludables de HDL (mayores a 40 mg/dL) y no presentan complicaciones como la hipertensión arterial. Los que no cumplían con estas características se clasificaron como No-MHO.

### **Subgrupos de pacientes diabéticos y controles.**

Con el fin de determinar la frecuencia de la variante -565C>T de ABCA1 en individuos con diabetes tipo 2, se analizaron distintos subgrupos de pacientes con características específicas. Cada subgrupo está determinado por la edad de inicio de la enfermedad, su asociación con obesidad o el grado de disfunción de la célula  $\beta$  pancreática.

De esta forma, se incluyeron hombres y mujeres mayores de 18 años de los cuales:

- a) 30 individuos con DT2 de inicio temprano y 30 de inicio tardío (definidos como individuos diagnosticados antes o después de los 45 años de edad, respectivamente)
- b) 30 individuos con DT2 obesos y 30 no obesos de acuerdo a los valores de IMC y
- c) 62 pacientes con disfunción secretoria de la célula  $\beta$  (índice secretorio menor al 20% de acuerdo a valores de HOMA- $\beta$ ).

Además, se incluyeron 60 sujetos control para diabetes, hombres y mujeres con

niveles normales de glucosa en ayuno, sin antecedentes de familiares de DT2 en primer grado o abuelos y una edad mayor de 45 años. Los controles están divididos en 30 obesos ( $IMC > 30 \text{ Kg/m}^2$ ) y 30 no obesos ( $IMC \geq 18.5 \text{ Kg/m}^2$  y  $< 25 \text{ Kg/m}^2$ ).

Todos los participantes son mexicanos de al menos 3 generaciones y han firmado la carta de consentimiento informado.

Esta parte del proyecto tuvo un propósito exploratorio y descriptivo por lo que solo se incluyó un número reducido de individuos bien caracterizados. Por lo tanto, en la sección de resultados solo se analizaron las frecuencias alélicas y genotípicas del SNP en los distintos grupos de estudio.

### **Determinación de los parámetros clínicos y bioquímicos.**

La presión arterial se midió con el sujeto en la posición supina después de un descanso de cinco minutos. La altura y el peso corporal se midió en una balanza calibrada. El IMC fue calculado como el peso (Kg) dividido por la altura en metros al cuadrado ( $\text{m}^2$ ). La circunferencia de cintura se midió en el punto medio entre el punto más alto de la cresta ilíaca y la parte más baja del reborde costal en la línea axilar media. Se extrajo una muestra de sangre por personal capacitado y el suero se congeló en hielo seco hasta el momento de analizarlo.

Todas las mediciones bioquímicas se realizaron en el Departamento de Endocrinología y Metabolismo de lípidos del IMCMNSZ utilizando procedimientos estandarizados y reactivos comerciales. La glucosa sérica se midió utilizando el método de la glucosa oxidasa. Los niveles plasmáticos de colesterol total (CT) y triglicéridos (TG) se midieron a través de métodos enzimáticos (Boehringer-Mannheim). Los niveles plasmáticos de HDL se midieron usando ácido fosfotúngstico y  $\text{Mg}^{2+}$ . Los niveles de insulina se midieron por radioinmunoanálisis (RIU) y los niveles de apoA-I y apoB se midieron con un reactivo comercial (Beckman).

La diabetes se diagnosticó cuando la glucosa plasmática en ayuno era mayor a 126 mg/dl de acuerdo con los criterios de la ADA (*American Diabetes Association* por sus siglas en inglés). La obesidad abdominal se definió por la presencia de un aumento de la circunferencia de cintura (  $> 90 \text{ cm}$  en hombres y  $> 80 \text{ cm}$  en mujeres). La hipertensión se diagnosticó cuando la presión arterial era  $> 140/90 \text{ mm Hg}$ .

También se calcularon los índices de evaluación del modelo homeostático HOMA. Dichos índices se calculan a partir de los datos de glucosa e insulina en ayuno para los pacientes diabéticos.

El HOMA  $\beta$  permite evaluar el grado (porcentaje) de disfunción de la célula  $\beta$ , HOMA IR determina la resistencia a la insulina y el HOMA S determina el porcentaje de sensibilidad a la insulina por parte de los órganos blancos.

Su fórmulas son las siguientes:

$$\text{HOMA } \beta \text{ (\% de disfunción de la célula } \beta \text{)} = 20 \times \text{insulina} / \text{glucosa} - 3.5$$

$$\text{HOMA IR (resistencia a la insulina)} = \text{insulina} \times \text{glucosa} / 405$$

$$\text{HOMA S (sensibilidad a la insulina)} = 1 / \text{HOMA IR}$$

Donde: glucosa (mg/dL) e insulina ( $\mu$ U/mL).

### **Extracción de DNA a partir de sangre venosa (QIAamp 96 plates blood kit Qiagen®).**

El primer paso consiste en romper la membrana de los leucocitos presentes en la muestra y de sus núcleos que contienen el DNA. Esto se logra utilizando proteasas, detergentes, soluciones hiperosmóticas o congelamiento.

Una vez liberado el DNA, es necesario inactivar las nucleasas que lo puedan degradar, esto se realiza agregando quelantes que pueden eliminar los cofactores de estas enzimas o con la adición de proteinasa K.

La técnica consiste en los siguientes pasos:

1. Descongelar las muestras y organizar la lista de las muestras.
2. Adicionar 20  $\mu$ l de proteasa Qiagen® en los pozos de la placa 1.
3. Agitar la sangre y adicionar 300  $\mu$ l a cada pozo.
4. Agregar 300  $\mu$ l de amortiguador de lisis AL Qiagen® a cada pozo.
5. Tapar cada pozo y agitar vigorosamente por 5 min.
6. Centrifugar a 1,512 x g para bajar la mezcla de reacción e incubar a 70 °C por 15 min.
7. Retirar de la estufa y volver a agitar vigorosamente por 5 min.

8. Centrifugar a 1,512 x g y volver a incubar a 70 °C por 15 min.
9. Pasar toda la muestra a la placa de columnas y tapar con maya cuidando que ajuste perfectamente.
10. Colocar la placa de columnas en la placa colectora y centrifugar a 2,363 x g por 15 min.
11. Retirar la maya y agregar 750 µl de amortiguador de lavados 1 AW1 Qiagen®.
12. Volver a colocar la malla y centrifugar a 2,363 x g por 5 min.
13. Retirar la malla y agregar 750 µl de amortiguador de lavados 2 AW2 Qiagen®.
14. Volver a colocar la malla y centrifugar a 2,363 x g por 15 min.
15. Agregar 300 µl de amortiguador de elución AE Qiagen® y colocar en la placa de elución.
16. Centrifugar por 6 min a 2,363 x g.
17. Etiquetar tubos eppendorf y transferir el volumen de la muestra de la placa de elución al tubo correspondiente.

### **Cuantificación del DNA (espectrofotometría).**

Debido a que las bases nitrogenadas cuentan con cadenas cíclicas de carbono, estas moléculas pueden absorber luz a una longitud de onda de máxima absorbencia de 260 nm. El espectrofotómetro es un instrumento que proyecta un haz de luz con la longitud de onda deseada a través de la muestra y así mide la “cantidad” de luz que está absorbe. A mayor luz absorbida, mayor es la concentración de la sustancia presente en la muestra.

El Nanodrop fue el espectrofotómetro utilizado, el cual no requiere de celtas para la cuantificación de la muestra, sino sólo 1 µl para la medición. Y tiene una sensibilidad de 5 a 3,000 ng/µl.

Para su uso, el equipo cuenta con un programa de computadora para su operación, una vez que el equipo es conectado a la computadora por medio de un puerto USB, se procede a abrir el programa. En el programa se selecciona el analito que se desea cuantificar (DNA de doble cadena) y posteriormente se fija el blanco (el blanco contiene todos los componentes del medio menos la sustancia a cuantificar, en este caso, DNA de doble cadena) se carga 1 µl de la muestra, se realiza la medición y se registra el resultado. Al finalizar se lava el equipo con agua miliQ®.

## **Revisión de la integridad del DNA (electroforesis en gel de agarosa).**

La electroforesis es un método en el que se utiliza la corriente eléctrica con la finalidad de separar las moléculas en relación a su tamaño y carga a través de una matriz de poro variable.

Como el DNA tiene una carga neta negativa, al estar presente en un campo eléctrico experimenta una fuerza de atracción hacia el polo positivo. El gel de agarosa consiste en un polímero soluble de alto peso molecular que conforma un tamiz por el cual, migran los solutos y retarda su paso. Las cadenas de DNA de mayor longitud atraviesan la membrana de forma más lenta que las cadenas de menor número de nucleótidos, lo que permite separarlas.

Los pasos a seguir para realizar esta técnica son los siguientes:

1. Preparar el amortiguador de corrida TAE 50x: agregar 242 g de Tris-Base, 57 mL de Ácido acético glacial y 100 ml de EDTA 0.5M. llevar a un volumen de 1000 ml.
2. Preparar una dilución de amortiguador de corrida TAE 1x.
3. Preparar el gel de agarosa al 2% (pesar 0.6g de agarosa y disolver en 30 ml de TAE 1X).
4. Fundir el gel hasta generar una mezcla homogénea.
5. Agregar 0.7  $\mu$ l de bromuro de etidio (el bromuro de etidio es un agente intercalante del DNA que al ser expuesto a la luz ultravioleta brilla de tal forma que permite observar el DNA presente en la muestra).
6. Mezclar y vaciar en el molde, colocar los peines y dejar enfriar.
7. Quitar los peines y sacar del molde. Posteriormente colocar el gel en la cámara de electroforesis.
8. Cubrir con amortiguador de corrida TAE 1x.
9. Preparar la muestra (mezclar 1-3  $\mu$ l de muestra con 1  $\mu$ l de amortiguador de carga, el amortiguador de carga en una mezcla de alta densidad que permite que la muestra permanezca dentro del pozo del gel) y cargar en los pozos.
10. Cerrar la cámara y conectar a la fuente de voltaje.
11. Correr la muestra por 30 min aproximadamente.
12. Retirar el gel y observar en el transluminador UV.



## **Amplificación de la región promotora del gen ABCA1 para la evaluación del SNP -565C>T de ABCA1 (reacción en cadena de la polimerasa).**

PCR (*Polymerase Chain Reaction* por sus siglas en inglés) o reacción en cadena de la polimerasa es una técnica de biología molecular descrita en 1986 por Kary Mullis, técnica de elección para la amplificación *in vitro* de secuencias de DNA de cualquier origen. En ella, se imita la habilidad natural de la célula de duplicar el DNA, utilizando una polimerasa que puede trabajar a temperaturas muy elevadas, que proviene de la bacteria *Thermus aquaticus* que vive en altas temperaturas (79°C a 85°C) de ahí su nombre comercial más conocido: Taq polimerasa.

En el tubo simulamos lo que sucede en la célula cuando se sintetiza el ADN, para hacerlo se agregan la polimerasa, el ADN del organismo de estudio, los oligonucleótidos (también llamados primers, iniciadores o cebadores), desoxinucleótidos trifosfatados (dNTPs) y las condiciones para que actúe la enzima (pH específico, magnesio [Mg<sup>2+</sup>], KCl).

El siguiente paso es colocar los tubos en un aparato llamado termociclador que sirve para calentar y enfriar los tubos de forma rápida y muy precisa. Se utilizan 3 fases o temperaturas en la reacción. La primera es a 95°C y es llamada desnaturalización, durante la cual las dobles cadenas de ADN se abren (desnaturalizan) quedando como cadenas sencillas. Luego el termociclador ajusta la temperatura en un rango de entre 40° C y 60° C llamado de alineamiento; a esta temperatura se unen los oligonucleótidos a su secuencia complementaria en el ADN genómico, creando una pequeña región de doble cadena donde la polimerasa se puede unir y comenzar a copiar en sentido 5' a 3'. Al agregar una base más, se estabiliza más la unión del oligonucleótido, permaneciendo ahí para el siguiente paso conocido como elongación o polimerización, donde se eleva la temperatura a 72° C (temperatura donde la polimerasa alcanza su máxima actividad) y continúa la síntesis del fragmento, completándose un ciclo de amplificación.

Posteriormente, la síntesis exponencial de un determinado fragmento de DNA se logra repitiendo este ciclo de desnaturalización, alineamiento de oligonucleótidos y extensión de 25 a 35 veces. Cabe mencionar que se programan 2 pasos más, uno al inicio de 96° C durante varios minutos para iniciar con la desnaturalización y otra al final de los ciclos, un paso elongación de 72° C más prolongado, para permitir que la

taq polimerasa termine de sintetizar los fragmentos que puedan haber quedado incompletos.

Para el diseño de los oligonucleótidos, se partió de la secuencia publicada en NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) para el gen de ABCA1 y su región promotora, utilizando el software para el diseño de oligonucleótidos disponible en la red en las siguientes direcciones:

1. Oligo Calc: Oligonucleotide Properties Calculator  
<http://www.basic.northwestern.edu/biotools/oligocalc.html>
2. Primer3 (v. 0.4.0) Pick primers from a DNA sequence.  
<http://frodo.wi.mit.edu/primer3/>
3. UCSC Genome Bioinformatics  
<http://genome.ucsc.edu/index.html?org=Human&db=hg18&hgsid=134679496>

---

**Tabla 3.** Oligonucleótidos utilizados para amplificar la región promotora del gen ABCA1.

---

Primer sentido	5' TTGTTTTTGTGGCCTCCTTC 3'
Primer antisentido	5' CCAGTGGAATTTGCTTCCTC 3'
Tamaño del fragmento: 367 pb	
Temperatura de alineamiento: 58.0°C	

---

Para el llevar a cabo la reacción de PCR se siguió el siguiente protocolo:

1. Preparar la mezcla de reacción en un tubo eppendorf de acuerdo a los volúmenes indicados en la tabla 2, sin agregar el DNA. Este se agrega en cada tubo de PCR. Dependiendo de los reactivos con que se cuente en el laboratorio, se puede realizar la realizar el procedimiento usando Taq Gold o Master Mix. Si se realizan 2 reacciones de PCR se hacen los cálculos para 3 mezclas de reacción y evitar quedarse sin mezcla al pasar a los tubos de PCR.
2. los tubos de PCR se llevan al termociclador previamente programado de acuerdo con la tabla 3.
3. Terminado el PCR se revisan las muestras en geles de agarosa para corroborar si hubo amplificación.

**Tabla 4.** Volúmenes para la preparación de la mezcla de reacción para la reacción de PCR.

Reactivos	Volumen (µL)	Volumen (µL)
Buffer de PCR	2.5	---
Mg <sup>2+</sup>	0.8	---
dNTPs	1.0	---
Oligos	0.5 c/u	1.5 c/u
Agua miliQ	17.5	4.0
Taq Gold	0.25*	---
Master Mix***	---	5.0*
Total	22.5	12.0
DNA purificado	2.5**	3.0**
Volumen Final	25.0	15.0

Nota:

\* La Taq Gold® (Taq polimerasa) o la Master Mix se agregan al final, para evitar que sean contaminadas.

\*\* El DNA de cada muestra se agrega a cada tubo de PCR.

\*\*\* La Master Mix (Hot Star Taq Master mix kit®) es un producto comercial que contiene todos los reactivos para el PCR excepto los oligonucleótidos.

**Tabla 5.** Ciclo de amplificación del fragmento del promotor de ABCA1.

1. Desnaturalización inicial	96°C por 6 min
Desnaturalización	95°C por 30 seg
2. 35 ciclos Alineación	58°C por 30 seg
Amplificación	72°C por 30 seg
3. Amplificación final	72°C por 10 min

### **Purificación en columna de membrana (QIAquick PCR purification kit, QIAGEN).**

Posterior a la amplificación del fragmento de PCR, es necesario purificarlo, para eliminar principalmente los restos de oligonucleótidos que no reaccionaron y que pueden interferir con la reacción de incorporación (secuenciación directa).

Para esto, se desarrolla el siguiente procedimiento:

1. Agregar 5 volúmenes de amortiguador PB Qiagen® a la reacción de PCR, mezclar y transferir la mezcla en el centro de la membrana de la columna.
2. La columna se coloca en un tubo colector y se centrifuga a máxima velocidad

- (12,303 x g) por 1 min.
3. Eliminar el sobrenadante y centrifugar a 10,483 x g por 1 min.
  4. Agregar 600 µl de amortiguador de lavados y centrifugar a 10,483 x g por 1 min.
  5. Eliminar el sobrenadante y centrifugar a máxima velocidad por 1 min.
  6. Transferir la columna a un tubo eppendorf rotulado correctamente.
  7. Agregar 20 µl de agua MilliQ en el centro de la membrana e incubar por 5 min a temperatura ambiente.
  8. Centrifugar por 1 min a 10,483 x g para recuperar la muestra.
  9. Revisar la concentración de la muestra por electroforesis en gel de agarosa.

### **Secuenciación del fragmento e identificación de la variable -565C>T de ABCA1 (secuenciación automatizada).**

La secuenciación directa del fragmento de PCR del promotor de ABCA1 se realiza utilizando un secuenciador marca Applied Biosystems® de electroforesis capilar. Durante la reacción de incorporación, se van generando fragmentos de distintos tamaños cuyo último nucleótido está marcado con un fluoróforo. Al realizarse la electroforesis capilar, los fragmentos de un nucleótido de diferencia se van alineando de menor a mayor antes de pasar por la ventana de detección. Uno a uno, los nucleótidos marcados con un fluoróforo, pasan por una ventana donde un láser los excita y emiten fluorescencia. La longitud de onda de emisión dependerá de la estructura química del fluoróforo con el que este marcado cada nucleótido (R6G para adenina, ROX para citosina, R110 para guanina, TAMRA para timina). La longitud de onda de emisión así como su intensidad son detectados por un mecanismo sensible a la fluorescencia.

Esta información es transferida a una computadora que crea un registro gráfico en 4 colores (cada uno identifica uno de las cuatro bases nitrogenadas) llamado electroferograma. Este registro muestra la secuencia de los nucleótidos amplificados por una PCR.

Las condiciones experimentales para la secuenciación automatizada del DNA son las siguientes:

1. Preparar la reacción de incorporación (DNA Sequencing kit BigDye Terminator v 3.1, Applied Biosystems®) según la siguiente tabla:

**Tabla 6.** Volúmenes para la preparación de la mezcla de reacción para la reacción de Incorporación para secuenciación directa.

Reactivos	Volumen (µL)
Amortiguador**	3.0
Oligo*	3.0
Agua miliQ	c.b.p. 20
BigDye***	1.0
DNA purificado	equivalente a 20ng
Volumen Final	20.0

Nota:

\* Solo se agrega uno de los oligonucleótidos ya que solo se va a secuenciar una de las cadenas, ya sea la cadena molde o la complementaria.

\*\* El Amortiguador de reacción contiene los nucleótidos marcados con fluoróforos, por lo que la reacción debe de protegerse de la luz.

\*\*\* El BigDye® contiene la polimerasa y debe agregarse al final para evitar contaminarla.

2. Las condiciones de la reacción de amplificación se presentan en la siguiente tabla. El ciclo siempre es el mismo sin importar el tamaño del fragmento. Una vez terminada la reacción, las muestras deben protegerse de la luz (Tabla 7).

**Tabla 7.** Ciclo de PCR para la reacción de incorporación.

1. Desnaturalización inicial	96°C por 3 min
Desnaturalización	95°C por 15 seg
2. 35 ciclos Alineación	52°C por 10 seg
Amplificación	60°C por 2 min
3. Amplificación final	60°C por 3 min

3. Purificar los productos de la reacción de incorporación en columnas de Sephadex (CentriSep, Applied Biosystems®). Para ello, se deben hidratar las columnas de Sephadex con 700 µL de agua MilliQ y homogeneizar con ayuda del vortex, evitando la formación de burbujas. Se dejan reposar por 1 hora a temperatura ambiente y posteriormente, se centrifugan a 655 x g por 1 min

para retirar el exceso de agua.

4. Se colocan las columnas ya hidratadas en tubos eppendorff etiquetados y se transfiere todo el volumen de la reacción de incorporación a la columna, evitando tocar las paredes. Centrifugar por 1 min a 655 x g.
5. Se secan los productos ya purificados en el rotoevaporador con vacío y calentamiento.
6. Una vez secos, los productos se resuspenden en 16 µl de una solución de formamida Hi – Di (Applied Biosystems®) y se colocan en una placa de 96 pozos.
7. Los productos se desnaturalizan en el termociclador a 95° C por 2 min e inmediatamente después, se llevan a 4° C.
8. Se transfiere la placa al secuenciador y se realiza la electroforesis capilar utilizando amortiguador TBE 1X y matriz de acrilamida (POP6, Applied Biosystems®).

### **Genotipificación de las muestras (discriminación alélica por PCR en tiempo real con sondas TaqMan®).**

La enzima Taq polimerasa no posee actividad correctiva de exonucleasa 3'–5' pero si tiene actividad de exonucleasa 5'–3'. Esta propiedad puede aprovecharse para facilitar la detección de alelos específicos. La técnica de PCR en tiempo real (RT-PCR por sus siglas en ingles) con sondas Taqman®, consiste en la hibridación del DNA con 3 oligonucleótidos, un par de oligos convencionales y 1 más que se une río arriba en la secuencia con respecto a uno de los oligos convencionales. Este último debe ser alelo específico. El oligo adicional lleva un grupo bloqueador en el extremo terminal 3' así que a el no se podrán unir nuevos nucleótidos, mientras que el extremo 5' lleva un grupo reportero. En la actualidad, este grupo reportero se trata de un fluoróforo.

El primer oligonucleótido permite la elongación de la cadena de DNA hasta que la Taq polimerasa encuentre el oligo alelo-específico, en este momento la enzima, gracias a su actividad de exonucleasa 5'–3', va a degradar al tercer oligo, provocando la liberación de los nucleótidos, incluyendo el que contiene el marcador, lo que produce un incremento observable en la fluorescencia. El equipo puede ir

registrando el incremento de la fluorescencia en cada ciclo (con un fin de análisis cuantitativo) o al final de la reacción (con un fin cualitativo).

Un ensayo de discriminación alélica es, un ensayo multiplex (mas de un par de primers/sonda por reacción) de punto final (los datos se recolectan al final del proceso de PCR) que puede detectar polimorfismos de un solo nucleótido (SNP). La presencia de dos pares de primers/sondas por cada reacción permite genotipificar las dos posibles variantes (SNPs) en cada muestra. La prueba no tiene un fin cuantitativo sino cualitativo.

Por cada muestra en un ensayo de discriminación alélica, se utiliza un único par de sondas fluorescentes, por ejemplo: dos sondas TaqMan MGB que detectan un mismo locus de SNP. Una de las sondas fluorescentes tiene perfecta complementaridad con el SNP silvestre (alelo 1) mientras que la otra sonda fluorescente tiene perfecta complementaridad con la variante (alelo 2). El ensayo mide el aumento de la fluorescencia de la sonda asociada al polimorfismo presente en la muestra. De esta forma, la prueba de discriminación alélica clasifica a una muestra desconocida como “homocigoto” si la muestra solo tiene el alelo 1 o el alelo 2, y como “heterocigoto” a la muestra que contenga ambos alelos 1 y 2.

El procedimiento para una prueba de discriminación alélica con sonda Taqman® es el siguiente:

1. Preparar la mezcla de reacción de acuerdo a las indicaciones del fabricante.
2. Cargar las muestras en la placa de 384 pozos. Incluir siempre, al menos 3 controles de agua y 1 control para cada uno de los genotipos (el homocigoto “AA”, el homocigoto “aa” y el heterocigoto “Aa”).
3. Programar el equipo de acuerdo al manual del usuario y a la versión del programa que se este utilizando.

### **Genotipificación en plataforma comercial KBiosciences®**

La compañía KBiosciences® (Hertfordshire, U.K.) utiliza el sistema KASPar®, el cual consiste en un sistema de genotipificación alelo-específico por PCR con patente en trámite (<http://www.kbiosciences.co.uk>). Las muestras de los individuos obesos y los controles delgados se extrajeron y el DNA fue enviado para su genotipificación,

cargando las muestras en placas para facilitar su manejo. Se incluyeron controles negativos y muestras duplicadas en cada placa como control de la genotipificación.

### **Análisis estadístico. Equilibrio de Hardy-Weinberg.**

Las frecuencias fenotípicas y genotípicas del polimorfismo se analizaron en los grupos por separado, para determinar si se encontraban en equilibrio de Hardy-Weinberg.

El principio de equilibrio de Hardy-Weinberg determina que frecuencias genotípicas deben observarse en la población en función a las frecuencias de los alelos.

Si en una población se observan 2 alelos, por ejemplo p y q, estos darán origen a 3 genotipos: pp, pq y qq, respectivamente. Si la frecuencia del alelo p = a y la frecuencia del alelo q = b, entonces las frecuencias de los genotipos quedan definidas por el trinomio cuadrado perfecto.

$$(a+b)^2 = a^2 + 2ab + b^2$$

donde:

Frecuencia genotípica de pp =  $a^2$

Frecuencia genotípica de pq =  $2ab$

Frecuencia genotípica de qq =  $b^2$

La suma de las frecuencias alélicas de p + q es igual a 1 y así mismo, la suma de las frecuencias genotípicas de pp + pq + qq = 1.

Para determinar si los distintos grupos en un estudio de asociación caso-control se encuentra en equilibrio, se obtienen, en primera instancia, las frecuencias alélicas en cada grupo por separado. Se resuelve el trinomio cuadrado perfecto para obtener las frecuencias genotípicas esperadas para una población en equilibrio y se comparan con las frecuencias genotípicas observadas por medio de la prueba de ji-cuadrada. Si no se observan diferencias estadísticamente significativas con respecto a las frecuencias genotípicas esperadas, entonces el grupo se encuentra en equilibrio de Hardy-Weinberg ( $p > 0.05$ ).

El equilibrio se mantiene si, la transmisión de los alelos de los progenitores a los descendientes es aleatoria y no ocurren fenómenos distorsionadores, como la



selección de alelos. Si uno de los grupos no se encuentra en equilibrio, es posible que la muestra se encuentre sesgada y por lo tanto, al realizar el estudio de asociación caso-control los resultados puedan darnos asociación falsa. En estos casos, es necesario revisar el método de genotipificación, pues en ocasiones se producen sesgos al interpretar los resultados. Otra posibilidad es que los individuos no sean independientes (por ejemplo por consanguinidad). En el grupo de casos es posible que no se cumpla el equilibrio de Hardy-Weinberg. Ello puede ser indicativo de que el polimorfismo puede estar asociado con la enfermedad.

Se utilizó el paquete estadístico STATA10® para estudiar el equilibrio de Hardy-Weinberg en nuestra población.

### **Análisis estadísticos de las variables.**

Una vez que los individuos fueron genotipificados, se registraron los resultados en una base de datos que incluye además, todos los datos provenientes de los cuestionarios y las determinaciones bioquímicas en sangre. Los datos se capturaron en hojas de cálculo de Microsoft Excel® y se analizaron en el programa STATA10®. Los datos de las variables continuas se expresan en media  $\pm$  desviación estándar. Para las variables categóricas los valores se expresan en porcentaje. Se realizaron pruebas de ji-cuadrada para probar las diferencias entre las variables categóricas. Las variables continuas se analizaron mediante la prueba de T de Student.

El polimorfismo se analizó bajo el modelo de herencia dominante, basándose en lo observado en el análisis de la variante R230C de ABCA1, donde se encontró asociación con este modelo de herencia. En el modelo dominante, se asume que, basta ser portador de tan solo una copia del alelo T para aumentar el riesgo a desarrollar la enfermedad, por lo tanto, los individuos homocigotos TT y los heterocigotos CT tienen el mismo riesgo. Se compara entonces, la frecuencia de estos dos genotipos juntos, con respecto a los homocigotos CC.

Las razones de momios (OR, odds ratio) se calcularon mediante modelos de regresión logística no condicional ajustando por edad y sexo. Un valor de  $p < 0.05$  se consideró como estadísticamente significativo.

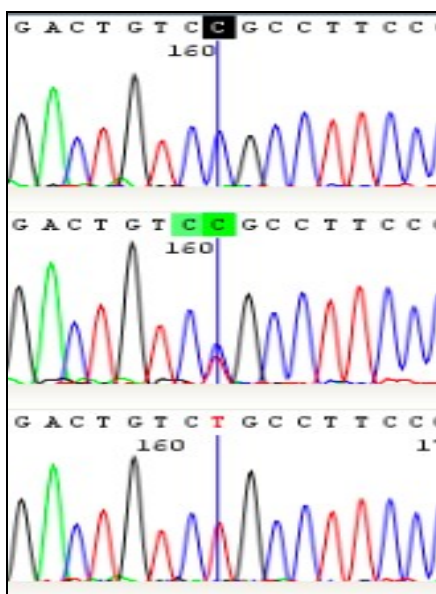
## XII. Resultados

### Secuenciación parcial de promotor de ABCA1.

Con el fin de contar con controles de los tres genotipos posibles durante el proceso de genotipificación utilizando RT-PCR / ensayos KASPar, se secuenciaron 50 individuos de población abierta (ENSA 2000). Se observó un cambio de timina (T) por una citosina (C) en la posición -565 del promotor de ABCA1, en el nucleótido 160 del fragmento diseñado para su secuenciación.

Se lograron identificar individuos con los tres genotipos, el homocigoto para el alelo silvestre (CC), homocigoto para el alelo de riesgo (TT) e individuos heterocigotos, los cuales presenta los alelos C y T (CT).

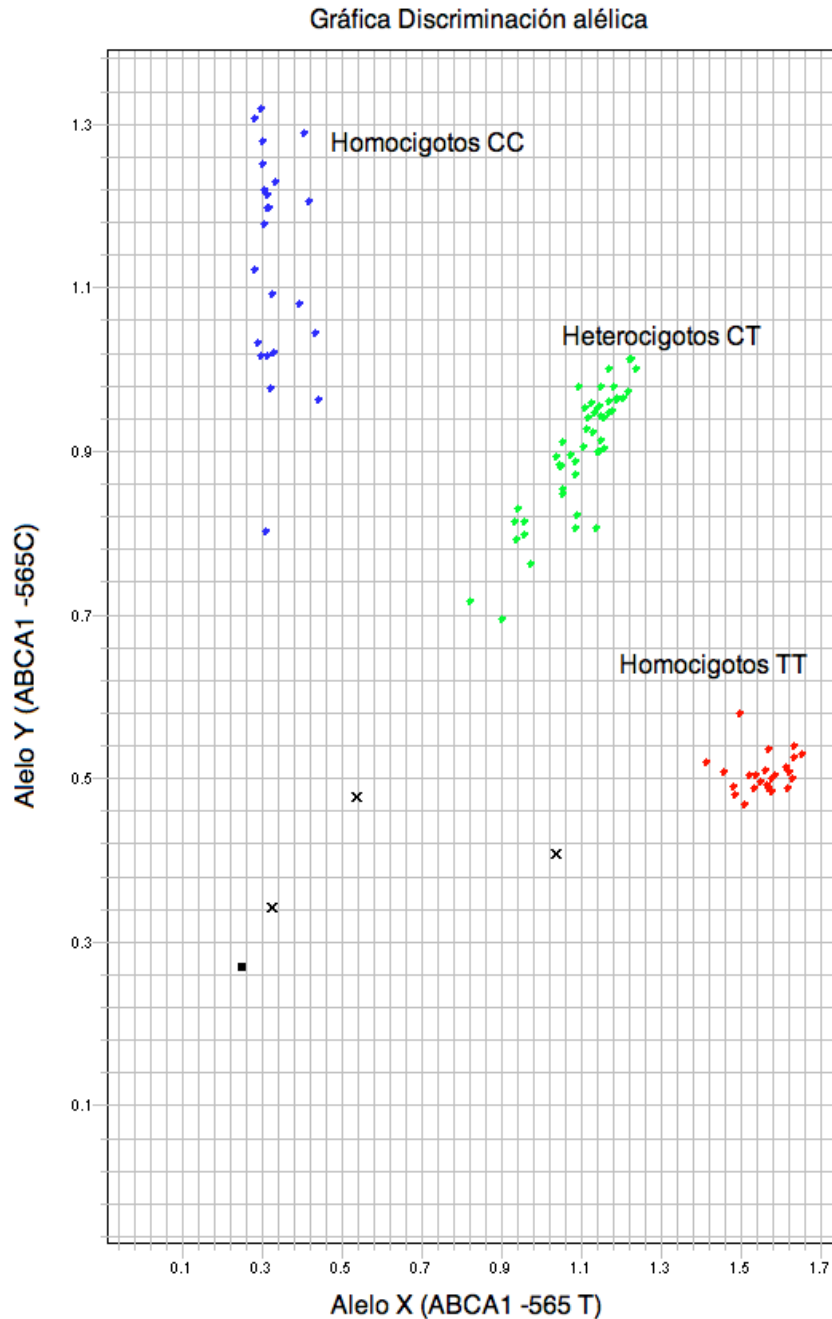
Se seleccionaron 3 de individuos, uno por cada genotipo, para ser incluidos en cada una de las corridas de RT-PCR, y de esta manera, corroborar los resultados.



**Figura 8. Electroferograma de 3 individuos,** un homocigoto para el alelo C, un heterocigoto CT y un homocigoto para el alelo T respectivamente. La línea indica la posición del SNP en el fragmento. La curva azul indica la presencia de citosina en uno de los alelos, mientras que la curva roja indica la presencia de timina en el otro alelo. En los individuos homocigotos, solo se observa una curva, ya que ambos alelos presentan el mismo nucleótido, mientras que en el individuo heterocigoto se observan las curvas de los dos alelos superpuestas.

### Genotipificación de la variante -565C>T de ABCA1 por RT-PCR con sondas Taqman®.

Mediante esta técnica se genotipificaron los individuos obesos mórbidos, los individuos de población abierta de la ENSA 2000 y los sujetos de los subgrupos de DT2 y sus controles.



**Figura 9. Genotipificación de la variante -565C>T del promotor de ABCA1 por discriminación alélica con sondas Taqman®.**

La sonda complementaria al alelo C está marcada con el fluoróforo VIC, cuya fluorescencia se grafica en el eje de las Y. La sonda complementaria al alelo T está marcada con el fluoróforo FAM, cuya fluorescencia se grafica en el eje de las X. Cada punto representa una muestra. Los homocigotos CC aparecen como puntos azules (solo fluoresce VIC). Los homocigotos TT aparecen como puntos rojos (solo fluoresce FAM) los heterocigotos CT que emiten la fluorescencia de ambas sondas aparecen en verde. El punto negro representa al control negativo (no emite fluorescencia) y las "x" corresponden a las muestras que no amplificaron en la reacción.

Fue posible genotipificar el 99% de los individuos que se analizaron por la técnica de PCR-RT con sondas Taqman®. Se confirmaron estos resultados con los controles positivos que se secuenciaron previamente, coincidiendo el resultado del genotipo por ambos métodos en el 100% de las repeticiones (Figura 9).

#### **Genotipificación con la plataforma comercial KBiosciences®.**

Por medio del ensayo KASPar® fue posible genotipificar el 90% de los individuos enviados del estudio de asociación para obesidad, de los cuales, 202 son controles (delgados) y 240 obesos (casos).

Igualmente, las muestras duplicadas (controles de genotipificación) coincidieron en su totalidad, lo que permitió validar el ensayo.

#### **Características clínicas y bioquímicas de los grupos de estudio de obesidad.**

Los 202 sujetos mexicanos se clasificaron como delgados de acuerdo con los criterios recomendados por la OMS (IMC dentro del rango de 18.5 a 24.9 Kg/m<sup>2</sup>), 240 individuos se clasificaron con obesidad (IMC entre 30 y 39.9 Kg/m<sup>2</sup>) y se incluyeron 100 individuos clasificados con obesidad mórbida (IMC igual o mayor a 40 Kg/m<sup>2</sup>) en un diseño de asociación caso-control. En la Tabla 8 se presentan las características clínicas y bioquímicas de interés en la muestra estudiada y las diferencias significativas entre grupos (Tabla 8).

Además de las diferencias obvias de IMC y circunferencia de cintura se observan diferencias en cada una de las variables de interés analizadas entre los sujetos delgados y los sujetos obesos con excepción en el género y los niveles de colesterol total, donde no se observaron diferencias. La edad, los niveles de triglicéridos, LDL y glucosa son significativamente mayores en el grupo de obesos con respecto al grupo de individuos delgados, mientras que los niveles de HDL son significativamente menores en los individuos obesos (Tabla 8).

Por su parte, los niveles de triglicéridos y colesterol total son significativamente menores en obesos mórbidos con respecto a los sujetos obesos. La edad y la proporción de hombres también fue menor en el grupo de obesos mórbidos en comparación con el grupo de sujetos delgados y sujetos obesos. La circunferencia de cintura y el nivel de glucosa es significativamente mayor en obesos mórbidos que

en sujetos obesos. No se observaron diferencias en los niveles de HDL y LDL (Tabla 8).

<b>Tabla 8.</b> Características clínicas y bioquímicas de los grupos de estudio de obesidad.			
	<b>Delgados</b>	<b>Obesos</b>	<b>O. Mórbidos</b>
Número	202	240	100
Hombres (%)	38.12	35.83	20.00 †
Edad (años)	43.43 ± 9.64	44.52 ± 8.06 *	36.73 ± 11.94 †
IMC (Kg/m <sup>2</sup> )	23.48 ± 1.28	33.29 ± 2.81 *	47.39 ± 7.54 †
Circunferencia de cintura (cm)	83.56 ± 7.46	103.15 ± 11.23 *	128.96 ± 14.75 †
Triglicéridos (mg/dL)	150.59 ± 89.76	224.7 ± 135.19 *	182.25 ± 88.09 †
Colesterol total (mg/dL)	203.85 ± 38.09	210.01 ± 38.78	192.88 ± 37.15 †
HDL (mg/dL)	47.76 ± 12.95	42.88 ± 10.59 *	40.09 ± 9.72
LDL (mg/dL)	124.69 ± 33.53	115.96 ± 48.53 *	106.65 ± 41.16
Glucosa (mg/dL)	85.53 ± 8.63	92.75 ± 14.66 *	95.64 ± 23.26 †

Los datos se presentan como media ± DE, o bien, porcentaje.

El valor de p para las diferencias entre los grupos se determinó por t de Student para muestras independientes, o bien, por chi-cuadrada para variables categóricas.

\* p<0.05 significativa entre grupo Delgados vs Obesos.

† p<0.05 significativa entre grupo Obesos vs O. Mórbidos.

IMC: Índice de masa corporal, HDL: High density lipoprotein (lipoproteína de alta densidad), LDL: Low density lipoprotein (lipoproteína de baja densidad).

El análisis de las frecuencias del polimorfismo -565C>T de ABCA1 en los sujetos delgados reveló que 47 de ellos son homocigotos para CC (23.3%), 97 son heterocigotos CT (48.0%) y 58 son homocigotos TT (28.7%), de tal forma que, el 76.7% de los sujetos delgados portan el alelo T (Tabla 9).

En el grupo de obesos, se observa que 62 de ellos son homocigotos TT (25.8%) y 111 son heterocigotos CT (46.3%), esto plantea que el 72.1% de la muestra de los obesos estudiados portan el alelo T. En el grupo de obesos mórbidos, se observa que 24 de ellos son homocigotos TT y 62 son heterocigotos CT, por lo que el 86.0% de los obesos mórbidos son portadores del alelo T (Tabla 9).

El alelo T esta presente en el 52.7% de la muestra de sujetos delgados, el 49.0% de los sujetos obesos y en el 56.8% de los sujetos obesos mórbidos (Tabla 9).

En el grupo de sujetos delgados y en el grupo individuos de obesos, la distribución de las frecuencias observadas en los genotipos CC, CT y TT no difirió de la esperada bajo el supuesto de equilibrio de Hardy-Weinberg, sin embargo, esto no ocurre con

los sujetos con obesidad mórbida donde el equilibrio de HW no se mantuvo. En este grupo, la falta de equilibrio de HW puede representar una posible asociación del polimorfismo con el padecimiento (Tabla 9).

**Tabla 9.** Frecuencias genotípicas y alélicas del SNP -565C>T del promotor de ABCA1 en sujetos delgados, obesos y obesos mórbidos.

	<b>Delgados n (%)</b>	<b>Obesos n (%)</b>	<b>Obesos Mórbidos n (%)</b>
Genotipo			
CC	47 (23.3)	67 (27.9)	14 (14.0)
CT	97 (48.0)	111 (46.3)	62 (62.0)
TT	58 (28.7)	62 (25.8)	24 (24.0)
Alelo			
C	0.473	0.510	0.432
T	0.527	0.490	0.568
HW	p=0.601	p=0.248	p=0.026

HW p corresponde a la p obtenida por prueba de ji-cuadrada para evaluar el equilibrio de Hardy-Weinberg; p>0.05 indica que la población se encuentra en equilibrio.

### **Asociación de -565C>T de ABCA1 con obesidad / obesidad mórbida.**

La frecuencia de los genotipos con el alelo de riesgo (CT/TT) fue menor en los individuos obesos que en los individuos delgados sin encontrarse una asociación estadísticamente significativa con la obesidad después de ajustar el modelo por las variables confusoras como género, edad, circunferencia de cintura, triglicéridos y HDL (Tabla 10).

**Tabla 10.** Asociación de la variante -565C>T de ABCA1 con obesidad.

	<b>Fenotipo</b>		<b>OR</b>	<b>P</b>
	<b>CC n (%)</b>	<b>CT / TT n (%)</b>		
Delgados	47 (23.3)	155 (76.7)		
Obesos	67 (27.9)	173 (72.1)	0.852	0.665

OR: razón de momios (Odd Ratio) obtenida mediante un modelo de regresión logística para cada fenotipo.

El modelo de regresión logística fue ajustado por género, edad, circunferencia de cintura, triglicéridos y HDL. p<0.05 se considera como estadísticamente significativo.

Puesto que se han reportado diferencias genéticas entre individuos obesos y obesos mórbidos, es posible que el polimorfismo -565C>T de ABCA1 no se asocie directamente con el desarrollo de obesidad, pero pueda estar actuando como un

marcador de obesidad mórbida. Los genotipos CT / TT fueron significativamente más frecuentes en los sujetos obesos mórbidos que en los sujetos obesos después de ajustar por género, edad, circunferencia de cintura, triglicéridos y HDL ( $p=0.004$ ). Se obtuvo la razón de momios (OR) = 5.422, y un intervalo de confianza (IC) 95%: 1.713 - 17.165 (Tabla 11).

**Tabla 11.** Asociación de la variante -565C>T de ABCA1 entre obesidad vs obesidad mórbida.

	Fenotipo		OR	P
	CC n (%)	CT / TT n (%)		
Obesos	67 (27.9)	173 (72.1)		
Obesos mórbidos	14 (14.0)	86 (86.0)	5.422	<b>0.004</b>

OR: razón de momios (Odd Ratio) obtenida mediante un modelo de regresión logística para cada fenotipo.

El modelo de regresión logística fue ajustado por género, edad, circunferencia de cintura, triglicéridos y HDL.  $p<0.05$  se considera como estadísticamente significativo.

Por otro lado, la muestra de sujetos con obesidad mórbida se estratificó en dos subgrupos. Se clasificaron como metabólicamente sanos (MHO) aquellos individuos con HDL de al menos 40 mg/dL y que no presentan hipertensión arterial (presión arterial mayor de 140/90 mmHg) y de aquellos individuos obesos mórbidos que si presentan hipertensión y/o con niveles de HDL por debajo de los 40 mg/dL denominados obesos no-metabólicamente sanos (No-MHO).

Se identificaron 24 obesos metabólicamente sanos (MHO) y 76 obesos mórbidos no-metabólicamente sanos (No-MHO).

**Tabla 12.** Asociación de la variante -565C>T de ABCA1 entre MHO vs No-MHO.

	Fenotipo		OR	P
	CC n (%)	CT / TT n (%)		
MHO	6 (25.0)	18 (75.0)		
No-MHO	8 (10.5)	68 (89.5)	3.245	0.224

OR: razón de momios (Odd Ratio) obtenida mediante un modelo de regresión logística para cada fenotipo.

El modelo de regresión logística fue ajustado por género, edad, circunferencia de cintura, triglicéridos y HDL.  $p<0.05$  se considera como estadísticamente significativo.

Se comparó la frecuencia de los genotipos CT / TT entre los obesos mórbidos MHO y los No-MHO, con la intención de identificar si existe asociación entre el polimorfismo y pertenecer al fenotipo obeso metabólicamente sano o no. Los genotipos CT / TT

fueron mas frecuentes en los sujetos no-metabólicamente sanos, sin embargo, esta diferencia no fue estadísticamente significativa después de ajustar por genero, edad, circunferencia de cintura, triglicéridos y HDL (Tabla 12).

La falta de asociación puede deberse al número reducido de individuos, particularmente los sujetos metabólicamente sanos, por lo que será de importante incrementar el tamaño de la muestra para confirmar o descartar la posible asociación del polimorfismo -565C>T de ABCA1, con la obesidad mórbida en sujetos no metabólicamente sanos (Tabla 12).

### **Comparación de los rasgos metabólicos de los sujetos delgados, obesos y obesos mórbidos de acuerdo a la variante -565C>T de ABCA1.**

Los rasgos metabólicos más importantes asociados con el desarrollo de obesidad y obesidad mórbida se presentan en las siguientes tablas en donde, se describen las mismas en cada uno de los grupos de estudio en un modelo dominante, comparando los individuos que portan la variante de riesgo (genotipos CT y TT) con los individuos sin la variante (genotipo CC).

<b>Tabla 13.</b> Asociación de la variante -565C>T de ABCA1 con rasgos cuantitativos en sujetos delgados.			
	<b>CC</b>	<b>CT / TT</b>	<b>p</b>
n	47 (23.3)	155 (76.7)	
IMC (Kg/m <sup>2</sup> )	23.8 ± 1.2	23.3 ± 1.31	0.210
Circunferencia de cintura (cm)	85.1 ± 7.2	83.1 ± 7.48	0.171
Triglicéridos (mg/dL)	138.8 ± 69.1	154.2 ± 95.05	0.136
Colesterol total (mg/dL)	199.9 ± 39.8	205.0 ± 37.58	0.378
HDL (mg/dL)	48.1 ± 13.9	47.6 ± 12.6	0.857
LDL (mg/dL)	120.3 ± 30.8	125.96 ± 34.3	0.111
Glucosa (mg/dL)	86.3 ± 7.74	85.3 ± 8.88	0.470

El valor de p corresponde al análisis de regresión lineal para cada variable cuantitativa comparando el efecto de los genotipos CT y TT con respecto al genotipo CC. Se ajustó el modelo por edad, género, IMC circunferencia de cintura, HDL y Tg.

IMC: índice de masa corporal, HDL: High density lipoprotein (lipoproteína de alta densidad), LDL: Low density lipoprotein (lipoproteína de baja densidad).

En el grupo de sujetos delgados no se observaron diferencias significativas en



ninguna de las variables analizadas. Los individuos con los genotipos CT / TT presentaron niveles más altos de triglicéridos, colesterol total y LDL y valores más bajos de circunferencia de cintura, HDL y glucosa que los individuos con el genotipo CC sin ser estas diferencias significativas. El modelo se ajustó por edad género, IMC circunferencia de cintura, HDL y triglicéridos (Tabla 13).

En el grupo de sujetos obesos, los individuos con los genotipos CT / TT no presentaron diferencias significativas en los niveles de IMC, circunferencia de cintura, colesterol total y glucosa con respecto a los individuos CC. Los niveles de triglicéridos y colesterol LDL resultaron significativamente mayores en los sujetos con la variante de riesgo CT / TT en comparación con los sujetos sin la variante ( $p=0.018$  para triglicéridos y  $p=0.002$  para C-LDL). De manera interesante, los niveles promedio de HDL resultaron ser más altos en los sujetos con la variante de riesgo T, a pesar que se ha reportado una disminución de los niveles de HDL en aquellos individuos con la variante de riesgo T del polimorfismo. El modelo se ajustó por edad, género, IMC circunferencia de cintura, HDL y triglicéridos (Tabla 14).

**Tabla 14.** Asociación de la variante -565C>T de ABCA1 con rasgos cuantitativos en sujetos obesos.

	CC	CT / TT	p
n	67 (27.9)	173 (72.1)	
IMC (Kg/m <sup>2</sup> )	33.24 ± 2.9	33.3 ± 2.9	0.669
Circunferencia de cintura (cm)	103.9 ± 10.3	102.87 ± 11.6	0.603
Triglicéridos (mg/dL)	203.7 ± 128.06	232.8 ± 137.3	<b>0.018</b>
Colesterol total (mg/dL)	197.5 ± 37.2	214.8 ± 38.4	0.082
HDL (mg/dL)	40.4 ± 8.5	43.85 ± 11.2	<b>0.004</b>
LDL (mg/dL)	103.6 ± 48.0	121.0 ± 48.0	<b>0.002</b>
Glucosa (mg/dL)	93.5 ± 14.1	92.43 ± 14.9	0.409

El valor de p corresponde al análisis de regresión lineal para cada variable cuantitativa comparando el efecto de los genotipos CT y TT con respecto al genotipo CC. Se ajustó el modelo por edad, género, IMC circunferencia de cintura, HDL y tg

IMC: índice de masa corporal, HDL: High density lipoprotein (lipoproteína de alta densidad), LDL: Low density lipoprotein (lipoproteína de baja densidad).

En el grupo de sujetos obesos mórbidos no se observaron diferencias significativas en ninguna de las variables analizadas. Los individuos con los genotipos CT / TT

presentaron niveles más altos de IMC y triglicéridos pero niveles más menores de circunferencia de cintura, colesterol HDL, colesterol LDL y glucosa que los individuos con el genotipo CC sin ser estas diferencias significativas. El modelo se ajustó también por edad género, IMC circunferencia de cintura, HDL y triglicéridos (Tabla 15).

**Tabla 15.** Asociación de la variante -565C>T de ABCA1 con rasgos cuantitativos en sujetos obesos mórbidos.

	CC	CT / TT	p
n	14 (14.0)	86 (86.0)	
IMC (Kg/m <sup>2</sup> )	46.8 ± 7.9	47.5 ± 7.5	0.109
Circunferencia de cintura (cm)	131.7 ± 14.9	129.6 ± 14.78	0.114
Triglicéridos (mg/dL)	136.9 ± 50.5	189.6 ± 90.9	0.139
Colesterol total (mg/dL)	200.4 ± 31.35	191.7 ± 38.0	0.325
HDL (mg/dL)	46.3 ± 11.7	39.1 ± 9.0	0.109
LDL (mg/dL)	126.7 ± 30.6	103.4 ± 41.9	0.230
Glucosa (mg/dL)	96.1 ± 14.5	95.5 ± 24.4	0.775

El valor de p corresponde al análisis de regresión lineal para cada variable cuantitativa comparando el efecto de los genotipos CT y TT con respecto al genotipo CC. Se ajustó el modelo por edad, género, IMC circunferencia de cintura, HDL y tg.

IMC: índice de masa corporal, HDL: High density lipoprotein (lipoproteína de alta densidad), LDL: Low density lipoprotein (lipoproteína de baja densidad).

### **Descripción de las frecuencias fenotípicas y alélicas de -565C>T de ABCA1 en subgrupos de DT2.**

Considerando que existe heterogeneidad clínica y genética entre los distintos subtipos de DT2, nos interesa analizar de manera exploratoria si podíamos evidenciar diferencias en las frecuencias alélicas y genotípicas del polimorfismo -565C>T de ABCA1, entre distintos subgrupos de pacientes y controles para DT2.

Se incluyeron hombres y mujeres por igual en todos los subgrupos y cada subgrupo estuvo determinado por la edad de diagnóstico de la enfermedad, si esta cursa con obesidad y la capacidad secretora de la célula β.

Se incluyeron 30 individuos con DT2 de inicio temprano (diagnosticados antes de los 45 años de edad) y 30 con DT2 de inicio tardío (diagnosticados después de los 45 años).

**Tabla 16.** Características clínicas y bioquímicas de los subgrupos de individuos diabéticos y controles no diabéticos.

	no diabéticos		Diabéticos				
	No-obesos	Obesos	Inicio temprano	Inicio tardío	No-obesos	Obesos	HOMA β bajo
Número	30	30	30	30	30	30	62
Hombres (%)	46.7	46.7	46.7	46.7	46.7	46.7	47.5
Edad (años)	54.0 ± 10.2	51.2 ± 5.7	45.6 ± 9.3	58.6 ± 7.8	55.9 ± 10.9	48.3 ± 9.4	52.4 ± 10.9
IMC (Kg/m <sup>2</sup> )	23.1 ± 1.7	34.6 ± 4.9	28.3 ± 6.8	29.4 ± 7.4	22.6 ± 1.5	35.1 ± 4.5	28.1 ± 5.7
Circunferencia de cintura (cm)	83.5 ± 7.5	109.4 ± 11.6	96.9 ± 17.9	102.9 ± 18.5	85.1 ± 5.9	114.7 ± 14.42	94.4 ± 14.9
Triglicéridos (mg/dL)	152.7 ± 106.8	195.5 ± 76.4	278.8 ± 222.8	211.2 ± 127.8	175.7 ± 100.8	314.3 ± 219.7	257.7 ± 197.2
HDL (mg/dL)	52.3 ± 15.4	39.4 ± 7.2	43.8 ± 10.6	45.5 ± 13.7	48.6 ± 13.8	40.7 ± 8.7	46.4 ± 15.2
LDL (mg/dL)	133.8 ± 28.3	129.4 ± 33.2	112.8 ± 33.7	121.1 ± 35.6	117.9 ± 34.2	116.0 ± 35.7	123.7 ± 33.6
Glucosa (mg/dL)	84.4 ± 7.3	88.5 ± 5.8	192.2 ± 90.8	178.3 ± 88.8	190.6 ± 92.9	179.8 ± 86.8	239.8 ± 100.7
Insulina (μU/mL)	5.9 ± 2.0	13.9 ± 7.4	11.9 ± 8.8	13.7 ± 10.2	6.0 ± 4.3	18.1 ± 9.0	7.6 ± 6.0
HOMA β (%)	117.7 ± 30.1	145.3 ± 49.4	50.3 ± 46.4	63.9 ± 58.8	32.1 ± 27.1	77.3 ± 60.1	9.7 ± 7.4
HOMA IR	0.9 ± 0.3	1.8 ± 0.9	2.0 ± 1.4	2.1 ± 1.3	1.1 ± 0.7	2.8 ± 1.2	1.4 ± 0.9

Los datos se presentan como media ± DE, o bien, porcentaje.

El valor de p para las diferencias entre los grupos se determinó por t de Student para muestras independientes, o bien, por chi-cuadrada para variables categóricas.

IMC: Índice de masa corporal, HDL: High density lipoprotein (lipoproteína de alta densidad), LDL: Low density lipoprotein (lipoproteína de baja densidad).

Además se incluyeron 30 individuos con DT2 que cursan con obesidad y 30 individuos con DT2 delgados (no obesos), por el posible efecto de la variante en la obesidad.

Adicionalmente, se analizaron 62 sujetos con DT2 cuyo índice secretorio de insulina (HOMA  $\beta$ ) es menor al 20%, bajo el supuesto de que este subgrupo podría tener un defecto secretorio de insulina como resultado en parte, de un proceso de lipotoxicidad por colesterol, a expensas de una menor expresión del gen ABCA1.

Por último, se incluyen 60 controles no diabéticos, 30 individuos obesos y 30 no obesos; hombres y mujeres sin diagnóstico de diabetes, niveles normales de glucosa, sin antecedentes familiares de DT2 y mayores de 45 años de edad, con lo cual se reduce el riesgo de incluir individuos que puedan desarrollar DT2 posteriormente.

Las características clínicas y bioquímicas de los subgrupos de individuos diabéticos y los controles no-diabéticos obesos y no obesos se presentan en la tabla 16. Además de las diferencias obvias entre subgrupos propias del diseño como lo son el IMC entre obesos y no obesos, el promedio de edad entre DT2 de inicio temprano e inicio tardío, la concentración de glucosa o el valor HOMA  $\beta$  de acuerdo los subgrupos, se observaron diferencias en otras variables asociadas como mayor circunferencia de cintura, mayor HOMA IR y niveles de triglicéridos en los subgrupos que incluyeron sujetos obesos pero menores niveles de HDL que en los subgrupos que incluyeron individuos no obesos (Tabla 16).

En la Tabla 17 se presentan las frecuencias alélicas y genotípicas de los subgrupos de pacientes diabéticos y los controles obesos y no obesos.

El grupo de individuos no diabéticos obesos fue el que presentó la mayor frecuencia del alelo de riesgo T (0.567), mientras que el grupo de individuos con DT2 de inicio tardío fue el que presentó la menor frecuencia del alelo T (0.466). Los grupos control de individuos no diabéticos no-obesos y de DT2 de inicio temprano presentan la misma frecuencia alélica (0.500), sin embargo, las frecuencias genotípicas son diferentes (Tabla 17).

De la misma manera, los grupos de diabéticos obesos y no obesos tienen la misma frecuencia alélica (0.483) pero difieren en las frecuencias genotípicas (Tabla 17).

El grupo de diabéticos con HOMA  $\beta$  bajo presentó una mayor frecuencia del alelo de

riesgo T (0.524) (Tabla 17).

**Tabla 17.** Frecuencias genotípicas y alélicas del SNP -565C>T de ABCA1 en subgrupos de DT2.

	No diabéticos		Diabéticos				
	No-obesos n (%)	Obesos n (%)	Inicio temprano n (%)	Inicio tardío n (%)	No-obesos n (%)	Obesos n (%)	HOMA β bajo n (%)
Genotipo							
CC	9 (30.0)	8 (26.7)	6 (20.0)	5 (16.7)	4 (13.3)	7 (23.3)	9 (14.5)
CT	12 (40.0)	10 (33.3)	18 (60.0)	22 (73.7)	23 (76.7)	17 (56.7)	41 (66.5)
TT	9 (30.0)	12 (40.0)	6 (20.0)	3 (10.0)	3 (10.0)	6 (20.0)	12 (19.0)
Alelo							
C	0.500	0.433	0.500	0.533	0.517	0.517	0.476
T	0.500	0.567	0.500	0.466	0.483	0.483	0.524
HW	0.273	0.078	0.273	0.009	0.003	0.461	0.010

HW p corresponde a la p obtenida por prueba de ji-cuadrada para evaluar el equilibrio de Hardy-Weinberg;  $p > 0.05$  indica que la población se encuentra en equilibrio.

Los grupos de diabéticos de inicio tardío, diabéticos no obesos y el grupo con HOMA β bajo no se encuentran en equilibrio de Hardy Weinberg por presentar un exceso de heterocigotos. El resto de los grupos se encuentran en equilibrio de HW (Tabla 17).

Aunque se observan aparentes diferencias en las frecuencias alélicas entre los distintos subgrupos analizados, estas no presentaran diferencias estadísticamente significativas con respecto a sus controles. Sin embargo, no se descarta que en un grupo más numeroso de individuos con DT2 y HOMA β bajo pudieran observarse diferencias significativas en las frecuencias alélicas y genotípicas y por lo tanto asociación de este subtipo de DT2 y la variante -565C>T de ABCA1 (Tabla 17).

### **XIII. Discusión**

Se determinó la frecuencia alélica del SNP -565C>T (rs2422493) de ABCA1 en una muestra de 100 individuos de la población abierta, obtenida de la ENSA 2000. La frecuencia del alelo T fue de 0.545, representando el alelo de mayor frecuencia en nuestra población. Cabe mencionar que el grupo de 100 sujetos analizados tiene una proporción igual de hombres y mujeres.

La frecuencia encontrada en nuestra muestra es significativamente mayor que la frecuencia alélica reportada en el Hapmap para la población Europea de 0.407 ( $p=0.021$ ), mientras que la frecuencia es similar a la observada en una muestra de México-americanos 0.540 ( $p=0.943$ ) reportada en el Hapmap.

El Hapmap es un catálogo de variantes genéticas comunes que están presentes en el genoma de los humanos. En esta base de datos se detalla la variación en términos del cambio de base, su posición en el ADN y su frecuencia en diferentes poblaciones del mundo. Considera información genética de poblaciones con ancestría africana, asiática y europea.

#### **Participación de la variante -565C>T de ABCA1 en el desarrollo de obesidad.**

Los controles delgados y los individuos obesos presentaron diferencias significativas en la mayoría de las variables analizadas, excepto en la proporción de hombres y colesterol total. Lo anterior es consistente con lo publicado previamente, donde, además de las obvias diferencias en el índice de masa corporal y circunferencia de cintura, los pacientes con obesidad presentan menores niveles de HDL pero una mayor concentración de triglicéridos, colesterol total, LDL y glucosa que los individuos de peso normal, además de un promedio de edad más alto para los individuos obesos.

Los niveles bajos de HDL se han asociado fuertemente con el desarrollo de obesidad, mientras que los niveles altos de glucosa pueden ser consecuencia de la resistencia a la insulina observada en los pacientes obesos (121).

Entre el grupo de delgados y obesos mórbidos se observaron diferencias significativas en todas las variables analizadas, incluso en la proporción de hombres,

que en la muestra de obesos mórbidos fue menor, lo cual es consistente con los datos ya publicados, donde se demuestra una mayor prevalencia de la obesidad mórbida en mujeres (24,25) incluyendo a la población mexicana, donde la prevalencia de obesidad mórbida en el 2006 fue, en mujeres del 3.7% y en hombres del 1.1% (26).

Entre el grupo de obesos y obesos mórbidos, no se observaron diferencias en los niveles de HDL y LDL, sin embargo, el promedio de edad y la proporción de hombres en la muestra de obesos mórbidos fue significativamente menor. Además de las diferencias obvias propias del diseño de los grupos como el IMC y la circunferencia de cintura, se observó una mayor concentración de glucosa en obesos mórbidos y menores niveles de triglicéridos y colesterol total.

A pesar de las diferencias clínicas y en las diferencias en las frecuencias alélicas y genotípicas entre los grupos, no se encontró asociación de la variante con el desarrollo de obesidad, al comparar sujetos delgados y obesos después de ajustar por edad y género triglicéridos y HDL. La circunferencia de cintura y el IMC no se incluyeron en el ajuste del modelo ya que predecían todas las asociaciones.

Desde hace tiempo se conoce el papel de la proteína ABCA1 en el transporte reverso de colesterol y la formación de partículas de HDL (61). El gen ABCA1 es responsable de la enfermedad de Tangier, una entidad autosómica recesiva poco frecuente que cursa con niveles muy bajos de HDL-C ( $< 5$  mg/dL), formación de depósitos de colesterol en macrófagos tisulares y en otros tejidos, así como un riesgo alto de EAC prematura (65). Sin embargo se sabe poco de su función en otros tipos celulares.

Aunque hay evidencia de que la regulación de la expresión de ABCA1 en el adipocito es tejido específica, se sabe poco sobre su función en este tipo celular. Le Lay et al. (122) encontraron que el gen ABCA1 es inducido de manera muy importante durante la diferenciación de pre-adipocitos 3T3-L1. Esta inducción no causó cambios en el contenido total de colesterol en la célula, pero sí causó un cambio en su distribución intracelular durante el proceso de diferenciación. Esto sugiere que el adipocito tiene poca capacidad para remover colesterol de la célula a través de ABCA1, lo cual es consistente con la función del adipocito.

En 2009, M. Xu et al. (123) encontraron una disminución significativa en la expresión

de ABCA1 en pacientes con sobrepeso y obesos en relación a individuos de peso normal ( $p < 0.01$ ).

Esto puede implicar que, una reducción de la actividad o en la expresión de ABCA1, como la que ocurre cuando se porta el alelo T del polimorfismo -565C>T de ABCA1, puede producir que el adipocito acumule aun más colesterol y triglicéridos, aumentando el riesgo a desarrollar obesidad. Esto ya se observó en el SNP R230C de ABCA1, donde la variante se asocia con una menor actividad de la proteína y con el desarrollo de obesidad en la población mestiza mexicana (89).

Al hacer el estudio de regresión logística entre sujetos obesos y sujetos con obesidad mórbida se encontró una asociación significativa aun después de ajustar por las variables confusoras edad, género, HDL y nivel de triglicéridos, siendo mas frecuente el alelo de riesgo T en los sujetos obesos mórbidos. Esto sugiere que, la variante -565C>T esta directamente asociada al desarrollo de la obesidad mórbida y que esta variante es un marcador de obesidad mórbida.

Es importante señalar que este estudio deberá incluir la corrección por ancestría para validar la asociación encontrada.

Es importante señalar también que se han observado diferencias genéticas entre grupos de obesos y obesos mórbidos. Se ha observado que los polimorfismos de FTO confieren una asociación altamente significativa con la obesidad particularmente con el tipo III, sugiriendo de FTO es uno de los principales genes de susceptibilidad para la obesidad mórbida en al población mexicana (118).

En el presente estudio, no se observaron diferencias significativas entre los subgrupos de obesos mórbidos MHO y No-MHO, lo cual puede deberse al número reducido de individuos analizados, por lo que será necesario analizar una muestra mayor de individuos, para tener un mayor poder estadístico.

### **Posible efecto de -565C>T ABCA1 en los niveles de HDL y otros rasgos metabólicos.**

El efecto de diversas variantes del gen ABCA1 en los niveles de colesterol HDL se ha estudiado ampliamente. Entre el 10 y el 16% de los individuos con HDL bajo presentan mutaciones en ABCA1 (80).

El SNP -14C>T del promotor y la variante R1587K de ABCA1 se ha asociado con



niveles bajos de HDL (81,82), mientras que las variantes no sinónimas V771M, V825I y I883M de ABCA1 han sido asociadas con elevados niveles de HDL (82,83,84).

Es interesante que en el presente estudio no se observó asociación entre el polimorfismo -565C>T de ABCA1 y los rasgos metabólicos analizados en el grupo de sujetos delgados y el grupos de obesos mórbidos después de ajustar por las variables confusoras. Sin embargo, la variante se relacionó con la disminución de los niveles de HDL en los individuos CT/TT de ambos grupos y niveles más altos de triglicéridos y LDL en los sujetos que portan el alelo de riesgo.

Por otro lado, en el grupo de sujetos obesos, si se observo un asociación significativa con un aumento en los niveles de triglicéridos y colesterol LDL y el alelo de riesgo, pero de manera interesante, se observó asociación con un incremento en los niveles de HDL en los genotipos CT/TT. Estas asociaciones fueron significativas aun después de ajustar por genero, edad, IMC, circunferencia de cintura, HDL y triglicéridos.

Kyriakou et al. (91) observaron la asociación del SNP -565C>T con el desarrollo de aterosclerosis severa y encontraron una disminución modesta en los niveles de HDL en individuos portadores del alelo de riesgo T sin que esta fuera significativa. Este proyecto estudió sujetos caucásicos con estenosis mayor al 50% en 1 a 16 segmentos de arterias coronarias, con un promedio de  $27.5 \pm 4.2$  Kg/m<sup>2</sup> de IMC, 10% de individuos diabéticos y más del 63% de hombres, por lo que la muestra que ellos analizaron difiere de forma significativa con la muestra de sujetos obesos de este estudio.

Por otro lado, el SNP -565C>T disminuye la expresión del gen de ABCA1 pero no la suprime. Esto puede observarse ya que no todos los homocigotos TT presentaron niveles bajos de HDL y no todos los heterocigotos CT presentaron niveles altos de HDL. También es interesante resaltar que los homocigotos TT y heterocigotos no presentaron diferencias significativas, lo que sugiere que el efecto no es dependiente de la dosis génica.

Existen alrededor de 50 diferentes genes involucrados en la regulación de los niveles de HDL (124), la presencia de variantes funcionales en algunos de estos genes (como por ejemplo la proteína transferidora de ésteres de colesterol o la lipasa hepática) aparte de otras mutaciones en ABCA1, podrían incrementar los niveles de

HDL y compensar el efecto negativo de la variante -565C>T de ABCA1 (125).

El encontrar asociación de la variante -565C>T de ABCA1 con niveles altos de HDL solo en los sujetos obesos sugiere que, en los sujetos delgados y en los obesos mórbidos pueden estar interactuando otros genes que modulan los niveles de HDL.

### **Posible participación de ABCA1 y el desarrollo de DT2**

El número de sujetos analizados en los distintos subgrupos no nos brinda información suficiente para reconocer una tendencia estadísticamente significativa de una mayor frecuencia del alelo de riesgo en un grupo en particular.

La obesidad es conocida por producir resistencia a la insulina y es el determinante principal para el desarrollo de DT2(121). Como la variante R230C se asoció con obesidad y con DT2 previamente, se determinó la frecuencia de la variante -565C>T en distintos subgrupos de pacientes con DT2 en presencia o no de obesidad. Se observó una diferencia importante en las frecuencias entre los controles obesos y no obesos, aunque para los subgrupos de pacientes diabéticos con y sin obesidad las frecuencias alélicas fueron las mismas.

El polimorfismo R230C se asoció con diabetes tipo 2, particularmente con DT2 de inicio temprano, incluso después de ajustar por ancestría (90). La frecuencia del alelo T de la variante 565C>T (variante de riesgo) es mayor en los pacientes DT2 de inicio temprano que en los pacientes con DT2 de inicio tardío. Además, la frecuencia del alelo T es mayor en los pacientes con HOMA  $\beta$  bajo. Aunque estos resultados no son concluyentes, es posible especular que con un número mayor de sujetos con DT2 de inicio temprano y/o con valores de HOMA  $\beta$  bajos, indicativos de un defecto secretorio severo de insulina, se pueda evidenciar asociación de esta variante.

Se conoce que ABCA1 se expresa ampliamente en la célula  $\beta$  pancreática(60), y puesto que la disfunción de ABCA1 puede causar acumulación intracelular de colesterol en diversos tipos celulares provocando citotoxicidad (61,62), ABCA1 podría estar implicado en el desarrollo de diabetes, particularmente en aquellos subtipos de diabetes tipo 2 donde se observa una importante reducción en la secreción de insulina, como es el caso de aquellos pacientes con niveles muy bajos de HOMA  $\beta$  y los pacientes con DT2 de inicio temprano.

El exceso de colesterol libre en la membrana o dentro de la célula es causa de

citotoxicidad, hecho que ha sido ampliamente estudiado en macrófagos (126). Los mecanismos involucrados en dicha citotoxicidad incluyen la pérdida de fluidez de la membrana celular que puede causar disfunción de las proteínas transmembranales, la disfunción de las “balsas lipídicas”, lo cual podría alterar diferentes cascadas de señalización, la inducción de la apoptosis, el daño oxidativo y la formación de oxisteroles tóxicos (127).

Además, se sabe que la insulina disminuye la expresión de ABCA1 en leucocitos y en adipocitos 3T3-L1, mientras que la glucosa aumenta la expresión de ABCA1 en leucocitos *in vivo* (128).

Por lo tanto consideramos que la posible asociación de la variante -565C>T con alguno de los subtipos de DT2 deberá evaluarse en una muestra de mayor tamaño, debido a que la frecuencia del alelo de riesgo (alelo T) es muy alta en la población mestiza mexicana.

#### **Limitaciones del estudio.**

Este proyecto incluyó un número relativamente bajos de sujetos de los distintos grupos, en los que se realizó el estudio de asociación caso-control. Consideramos por lo tanto necesario ampliar la muestra de individuos con obesidad mórbida, para tener un mayor poder estadístico que pueda soportar el ajuste por ancestría.

Los mestizos mexicanos son el resultado de la mezcla de las poblaciones de nativos americanos (grupos indígenas) y europeos (españoles) ocurrido durante la colonización española, con una menor contribución de la población africana (129,130). Por lo tanto, un diseño de estudio caso-control en población mestiza requiere del ajuste de la proporción de ancestría entre grupos de casos y controles.

Para lograr esto es necesario tipificar al menos 10 marcadores de ancestría en el grupo de sujetos delgados obesos y obesos mórbidos.

A pesar de que será necesario incluir el análisis de estratificación poblacional en el estudio de asociación caso/control, no tenemos evidencia para pensar que la variante -565C>T de ABCA1 pudiera ser exclusiva de poblaciones amerindias, como es el caso de la variante R230C de ABCA1. Se ha sugerido que la mayor susceptibilidad genética de la población mexicana a la obesidad y a la diabetes tipo 2 probablemente esté relacionada con su componente indígena (131,132).

Villarreal et al. (89) encontraron que, en casi todas las poblaciones indígenas analizadas, la frecuencia de la variante de riesgo del SNP R230C de ABCA1, es de aproximadamente el doble que la observada en mestizos mexicanos. La variante R230C es aparentemente un marcador informativo de ancestría amerindia, con una asociación significativa con niveles bajos de HDL, obesidad y comorbilidades relacionadas con la diabetes.

Nuestro estudio presenta algunas limitaciones que es necesario considerar. En primer lugar, se carece de datos sobre factores ambientales como dieta y actividad física de algunos de los participantes en el estudio, que podrían estar modificando el efecto de la variante estudiada. Tampoco se cuenta con el nivel de adiponectinas, principalmente adiponectina y leptina de todos los participantes, que como ya se mencionó anteriormente, juegan un papel importante en la obesidad y la obesidad mórbida. Tampoco contamos con la determinación de insulina en todas las muestras genotipificadas, por lo que no fue posible determinar los valores de HOMA IR en los distintos grupos de estudio, y determinar si existen o no asociaciones con la resistencia a la insulina en los sujetos obesos, obesos mórbidos y los controles delgados.

## XIV. Conclusiones

El alelo T del polimorfismo -565C>T de ABCA1 presentó una de las frecuencias más altas informadas en la literatura y su frecuencia presentó diferencias significativas con la reportada para poblaciones europeas.

Se evidenció la asociación de la -565C>T de ABCA1 a la obesidad mórbida, lo que sugiere que esta variante pudiera ser un marcador para la obesidad mórbida. Será importante realizar el estudio de ancestría para validar la asociación encontrada y que esta no sea debido al efecto de la estratificación de la población.

El sondeo de la variante en distintos subgrupos de DT2 no presentó diferencias significativas entre los ellos, sin embargo, tampoco se descarta que pudieran encontrarse asociaciones en una muestra mayor individuos, particularmente en aquellos con un defecto severo en la secreción de insulina (HOMA  $\beta$  bajo) o en individuos con DT2 de inicio temprano, tal como se ha descrito para la variante R230C de ABCA1.

Como perspectiva se planea realizar un estudio de asociación caso/control considerando ambos polimorfismos ( R230C y -565C>T de ABCA1 ) ya sea que estos presenten desequilibrio de ligamiento o no, para estudiar la posible asociación de haplotipos con la obesidad, la obesidad mórbida y la DT2 o bien el efecto aditivo de ellos sobre distintos rasgos bioquímicos.

Será importante también determinar el efecto funcional de esta variante en el adipocito y en la célula  $\beta$  pancreática a través de estudios *in vitro*.

La alta frecuencia de la variante en la población mexicana permitirá hacer estudios genotipo-fenotipo, y podrá así buscarse el posible efecto de esta variante en otros padecimientos en los cuales el metabolismo de los lípidos y el colesterol juegan un papel importante, como por ejemplo la función neurológica, en el riesgo de desarrollar aterosclerosis, infarto agudo al miocardio y enfermedad vascular.

Será importante evaluar la respuesta que tienen los portadores del alelo de riesgo T a diferentes tratamientos como dieta y ejercicio, o a la administración de medicamentos para obesidad o DT2 en un estudio a largo plazo.

La prevalencia de obesidad mórbida está aumentando a una velocidad alarmante en

nuestro país. Esta enfermedad forma parte de la epidemia de obesidad que afecta a los países industrializados y en vías de desarrollo. La gran prioridad en salud pública debería ser la prevención de la obesidad en el conjunto de la población.

Este trabajo contribuye al entendimiento del papel que tiene el gen ABCA1 en el desarrollo de la obesidad y la obesidad mórbida en la población mexicana, además de que permitió describir la frecuencia de esta variante en distintos subgrupos de pacientes con DT2 y en una muestra de población abierta mexicana, sentando las bases de estudios posteriores.

## XV. Bibliografía

1. World Health Organization. Obesity: preventing and managing the global epidemic. Report of a WHO consultation. Tech Rep Ser. 2000; 984:i-xii, 1-253.
2. Valdespino JL, Olaiz G, López-Barajas MP, Mendoza L, Palma O, Velázquez O, Tapia R, Sepúlveda J. Encuesta Nacional de Salud 2000. Tomo I y Tomo II. Vivienda, población y utilización de servicios de salud. Inst Nac de Sal Púb 2003.
3. Olaiz G, Rivera J, Shamah T, Rojas R, Villalpando S, Hernández M, Sepúlveda J, Encuesta Nacional de Salud y Nutrición 2006. Inst Nac de Sal Púb 2006.
4. Córdova J, Lee M, Hernández M, Aguilar-Salinas CA, Barriguet-Melendez JA, Kuri P, Lara-Esqueda A, Álvarez C, Molina-Cuevas V, Barquera S, Rosas-Peralta M, González A, Sánchez J, Rosas J, Rodríguez G. Numeralia 2008: Diabetes Mellitus. Diabet Hoy Med Sal. 2009; 10(1):2166-2178.
5. Shaw JE, Sicree RA, Zimmet PZ. Global estimates of the prevalence of diabetes for 2010 and 2030. Diabet Res & Clin Pract. 2010; 87: 4-14.
6. Velázquez MO, Rosas PM, Lara EA, Pastelín HG, Attie F, Tapia CR. Hipertensión arterial en México: Resultados de la encuesta Nacional de Salud (ENSA) 2000. Arch Cardiol Mex. 2002; 72(1): 71-84.
7. Tusié Luna MT. La genética de la diabetes mellitus tipo 2, Rev Invest Clin. 2005; 52: 296-305.
8. García-García E. ¿Qué es la obesidad? Rev Endocr & Nutr. 2008; 12:S88-S90.
9. Wadden TA, Stunkard AJ. Social and psychological consequences of obesity. Annals Internal Med. 1985; 3: 1062-1067.
10. Ferro-Luzzi A, Sette S, Franklin M, James WP. A simplified approach of assessing adult chronic energy deficiency. Eur J Clin Nutr 1992; 46: 176-186.
11. National Institutes of Health. Clinical Guidelines on the Identification, Evaluation and Treatment of Overweight and Obesity in Adults. The Evidence Report. Obes Res. 1998; 6(2): 51S-209S.
12. Barbany M, Foz M, Obesidad: concepto, clasificación y diagnóstico. ANALES

- Sis San Navarra. 2002; 25: 7-16.
13. Garrison RJ, Kannel WB, Stokes J, Castelli WP. Incidence and precursors of hypertension in young adults: the Framingham offspring study. *Prevent Med.* 1987; 16(2): 235–251.
  14. Wofford MR, Hall JE. Pathophysiology and treatment of obesity hypertension. *Curr Pharm Design.* 2004; 10(29):3621–3637.
  15. Martínez JA, Moreno MJ, Marques-lopés I, Martí A. Causes id obesity. *An Sist Sanit Navar.* 2002; 25(1): 17-27.
  16. García E, De la Llata M, Kaufer M, Tusié T, Calzada R, Velazquez V, Barquera S, Caballero A, Orozco L, Velázquez D, Rosas M, Barriguete A, Zacarías R, Sotelo J. La obesidad y el síndrome metabólico como problema de salud pública. Una reflexión. *Sal Públ de Méx.* 2008; 50: 530-547.
  17. Christophe J. Molecular endocrinology of hereditary obesity. *Bull Mem Acad R Med Belg.* 1997; 152: 189-194.
  18. Willett WC. Is dietary fat a major determinnt of body fat? *Am J Clin Nutr* 1998; 67: 556-562.
  19. Bray GA, Popkin BM. Dietary fat intake does affect obesity! *Am J Clin Nutr.* 1998; 68: 1157-1173.
  20. Martínez-González MA, Martínez JA, Hu FB, Gbney MJ, Kearney J. Physical inactivity, sedentarism lifestyle and obesity in the European Union. *Int J Obes.* 1999; 23: 1-10.
  21. Sengier A. Multifactorial etiology of obesity: nutritional and central aspects. *Rev Med Brux.* 2005; 26: S211-214.
  22. Sturm R. Increases in clinically severe obesity in the United States, 1986-2000. *Arch Intern Med* 2003; 163:2146–2148.
  23. Guisado JA, Vaz FJ. Características clínicas de los pacientes con obesidad mórbida. *Rev Psiq Fac Med Barna.* 2002; 29(2): 85-94.
  24. Freedman DS, Khan LK, Serdula MK, Galuska DA, Dietz WH. Trends and correlates of class 3 obesity in the United States from 1990 through 2000. *JAMA.* 2002; 288:1758–61.
  25. Basterra-Gortari FJ, Beunza JJ, Bes-Rastrollo M, Toledo E, García-López M, Martínez-González MA. Tendencia creciente de la prevalencia de obesidad



- mórbida en España: de 1,8 a 6,1 por mil en 14 años. *Rev Esp Cardiol.* 2011; 64(5):424-426.
26. Barquera S, Campos-Nonato I, Hernández-Barrera L, Flores M, Durazo-Arvizu R, Kanter R, Rivera JA. Obesity and central adiposity in Mexican adults: results from the Mexican National Health and Nutrition Survey. 2006. *Sal Pub Mex* 2009; 51(4):S595-S603.
  27. Fettes P, Williams DE. Assessment and treatment of morbid obesity. In: Thompson JK Body image, Eating disorders and Obesity. *Am Psych As.* 1996: 505.
  28. Sociedad Española para el Estudio de la Obesidad (SEEDO). Consenso SEEDO'2000 para la evaluación del sobrepeso y la obesidad y establecimiento de criterios de intervención terapéutica. *Med Clín.* 2000; 115: 587-597.
  29. Charles SC. Psychiatric evaluation of morbidly obese patients. *Gastro Clin North Am.* 1987; 16(3):415-432
  30. Hsu LKG, Betancourt S, Sullivan SP. Eating disturbances before and after vertical banded gastroplasty: a pilot study. *Int J Eat Disord.* 1996; 19(1): 23-34.
  31. Lang T, Hauser R, Schumpf R, Klaghofer R, Buddeberg C. Psychological comorbidity and quality of life of patients with morbid obesity and requesting gastric banding. *Shweiz Med Wochenschr.* 2000; 20: 739-748.
  32. Stunkard AJ, Mendelson M. Disturbances in body image in some obese persons. *J Am Diet Assoc.* 1961; 38: 328-331.
  33. McTigue K, Larson JC, Valoski A, Burke G, Kotchen J, Lewis CE, et al. Mortality and cardiac and vascular outcomes in extremely obese women. *JAMA.* 2006; 296:79–86.
  34. Karelis AD, Faraj M, Bastard JP, St-Pierre DH, Brochu M, Prud'homme D, Rabasa-Lhoret R. The metabolically healthy but obese individual presents a favorable inflammation profile. *J Clin Endocrinol Metab.* 2005; 90:4145– 4150.
  35. Karelis AD, Brochu M, Rabasa-Lhoret R. Can we identify metabolically healthy but obese individuals (MHO)? *Diabetes Metab.* 2004; 30:569 –572.
  36. Aguilar-Salinas CA, García-García E, Robles L, Riaño D, Ruiz-Gomez DG,

- García-Ulloa AC, Melgarejo MA, Zamora M, Guillen-Pineda LE, Mehta R, Canizales-Quinteros S, Tusié-Luna MT, Gómez-Pérez FJ. High Adiponectin concentrations are associated with the metabolically healthy obese phenotype. *J Clin Endocrinol Metab* 2008; 93(19): 4075-4079.
37. Kim JY, vander Wall E, Laplante M, Azzara A, Trujillo ME, Hofmann S, Schraw T, Durand J, Li H, Li G, Jelicks L, Mehler M, Hui D, Deshaies Y, Shulman G, Schwartz G, Scherer PE. Obesity-associated improvements in metabolic profile through expansion of adipose tissue. *J Clin Invest*. 2007; 117:2621–2637.
  38. Stumvoll M, Goldstein BJ, van Haeften TW. Type 2 Diabetes: Pathogenesis and Treatment. *Lancet*. 2008; 371:2153-6.
  39. Porterfield, SP, White AB. *Endocrine Physiology*. EUA: Elsevier 3<sup>rd</sup> Edition. 2007.
  40. Permutt MA, Wasson J, Cox N. Genetic epidemiology of diabetes. *J Clin Invest*. 2005; 115: 1431-1439.
  41. Leahy JL. Pathogenesis of Type 2 Diabetes Mellitus. *Arch Med Res*. 2005; 36: 197-209.
  42. Campbell RK. Fate of the beta-cell in the pathophysiology of type 2 diabetes. *Journal of the American Pharm Assoc*. 2009; 49(1):10-15.
  43. Aguilar-Salinas CA, Rojas R, Gomez-Perez FJ, Garcia E, Valles V, Rios-Torres JM, Franco A, Olaiz G, Sepulveda J, Rull JA. Prevalence and Characteristics of Early-Onset Type 2 Diabetes in Mexico. *Am J Med*. 2002; 113:569-574.
  44. García-García E, Aguilar-Salinas CA, Tusie-Luna T, Rull-Rodrigo JA. Early-Onset Type 2 Diabetes in Mexico. *Isr Med Assoc J*. 2002; 4:444-8.
  45. Song Y, Manson JE, Tinker L, Howard BV, Kuller LH, Nathan L, Rifai N, Liu S. Insuline sensitivity and insulin secretion determinad by homeostasis model assessment (HOMA) and risk of diabetes in a multiethnic cohort of women: The Women's Heath Initiative Observational Study. *Diabetes Care*. 2007; 30(7): 1747-1752.
  46. Colditz GA, Willett WC, Rotnitzky A, Manson JE. Weight gain as a risk factor for clinical diabetes mellitus in women. *Ann Intern Med*. 1995 ;122(7):481-6.
  47. U.S. Department of Health and Human Services Centers for Disease Control

- and Prevention. National diabetes fact sheet. 2007.
48. Poitout V, Amyot J, Semache M, Zarrouki B, Hagman D, Fontés G. Glucolipotoxicity of the pancreatic beta cell. *BBA*. 2009; 1801(3):289-298.
  49. Bell GI, Polansky KS. Diabetes mellitus and genetically programmed defects in  $\beta$ -cell function. *Nature*. 2001; 414: 788-791.
  50. Saltiel AR, Kahn CR. Insulin signalling and the regulation of glucose and lipid metabolism. *Nature*. 2001; 414: 799-806.
  51. Anderson RG. The caveolae membrane system. *Annu rev biochem* 1998; 67:199-225.
  52. Oram JF, Heineke JW. ATP-binding cassette transporter A1: a cell cholesterol exporter that protects against cardiovascular disease. *Physiol Rev* 2005; 85: 1343-1372.
  53. Fielding CJ, Fielding PE. Molecular physiology of reverse cholesterol transport. *J lipid Res*. 1995; 36: 211-28.
  54. Oram Jf, Yokoyama S. Apolipoprotein-mediated removal of cellular cholesterol and phospholipids. *J Lipid Res*. 1996; 37: 2473-2491.
  55. Yokoyama S. Assembly of high-density lipoprotein arterioscler. *Thromb genet* 2006; 26:20-27.
  56. Fredenrich A, Bayer P. Reverse cholesterol transport, high density lipoproteins and HDL cholesterol: recent data. *Diabetes Metab* 2003; 29: 201-5.
  57. Tall AR, Wang N. Tangier disease as a test of the reverse cholesterol transport hypothesis. *J Clin Invest*. 2000; 106: 1205-1207.
  58. Perley MJ, Kipnis DM. Plasma insulin responses to oral and intravenous glucose: studies in normal and diabetic subjects. *J Clin Invest*. 1967; 46:1954–1962.
  59. Kahn SE. The importance of beta-cell failure in the development and progression of type 2 diabetes. *J Clin Endocrinol Metab*. 2001; 86:4047–4058.
  60. Brunham LR, Kruit JK, Verchere CB, Hayden MR. Cholesterol in islet dysfunction and type 2 diabetes. *J Clin Invest*. 2008; 118:403-408.
  61. Brooks-Wilson A, Marcil I, Clee SM, Zhang LH, Roomp K, van Dam M, Yu L, Brewer C, Collins JA, Molhuizen HOF, Loubser O, Ouelette BFF, Fichter K, Ashbourne-Excoffon KJD, Sensen CW, Scherer S, Mott S, Denis M, Martindale

- D, Frohlich J, Morgan K, Koop B, Pimstone S, Kastelein JJP, Genest J, Hayden MR. Mutations in ABC1 in Tangier disease and familial high-density lipoprotein deficiency. *Nat. Genet.* 1999; 22:336–345.
62. Brunham LR, Kruit JK, Pape TD, Timmins JM, Reuwer AQ, VasANJI Z, Marsh BJ, Rodrigues B, Johnson JD, Parks JS, Verchere CB, Hayden MR. Beta-cell ABCA1 influences insulin secretion, glucose homeostasis and response to thiazolidinedione treatment. *Nat. Med.* 2007; 13:340–347.
63. Hao M, Head WS, Gunawardana SC, Hasty AH, Piston DW. Direct effect of cholesterol on insulin secretion: a novel mechanism for pancreatic beta-cell dysfunction. *Diabetes.* 2007; 56:2328–2338.
64. Wang Y, Thiele C, and Huttner WB. Cholesterol is required for the formation of regulated and constitutive secretory vesicles from the trans-Golgi network. *Traffic.* 2000; 1:952–962.
65. Rust S, Rosier M, Funke H, Real J, Amoura Z, Piette JC, Deleuze JF, Brewer HB, Devarger N, Deneffe P, Assmann G. Tangier disease is caused by mutations in the gene encoding ATP-Binding Cassette transporter 1. *Nat Genet* 1999; 22:352-355.
66. Hamon Y, Broccardo C, Chambenoit O, Luciani MF, Toti F, Chaslin S, Freyssinet JM, Devaux PF, McNeish J, Maguet D, Chimini G. ABCA1 promotes engulfment of apoptotic cells and transbilayer redistribution of phosphatidylserine. *Nat Cell Biol.* 2000; 2: 399-406.
67. Hamon Y, Trompier D, Ma Z, Venegas V, Pophillat M, Mignotte V, Zhou Z, Chimini G. Cooperation between Engulfment Receptors: The Case of ABCA1 and MEGF10. *PLoS ONE.* 2006; 1:e120.
68. Zha X, Gauthier A, Genest J, McPherson R. Secretory vesicular transport from the Golgi is altered during ATP-binding cassette protein A1 (ABCA1) mediated cholesterol efflux. *J Biol Chem.* 2003; 278: 10002-10005.
69. Santamarina-Fojo S, Peterson K, Knapper C, Qiu Y, Freeman L, Cheng JF, Osorio J, Remaley A, et al. Complete genomic sequence of the human ABCA1 gene: Analysis of the human and mouse ATP-binding cassette A promoter. *PNAS.* 2000; 97(14): 7987-7992.
70. Oram JF. HDL Apolipoproteins and ABCA1: Partners in the Removal of Excess

- Cellular Cholesterol. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2003; 23:720-727.
71. Fitzgerald ML, Mendez AJ, Moore KJ, Andersson LP, Panjeton HA, Freeman MW. ATP-binding cassette transporter A1 contains an NH<sub>2</sub>-terminal signal anchor sequence that translocates the protein's first hydrophilic domain to the exoplasmic space. *J Biol Chem.* 2001; 276: 15137-45.
  72. Burgers S, Moldy LL, Monday RS. Membrane topology of the ATP binding cassette transporter ABCr and its relationship to ABC1 and related ABCA transporters: identification of N-linked glycosylation sites. *J Biol Chem.* 2001; 276: 23539-46.
  73. Trompier D, Alibert M, Davanture S, Hamon Y, Pierres M, Chimini G. Transition from dimmers to higher oligomeric forms occurs during the ATPase cycle of the ABCA1 transporter. *J Biol Chem.* 2006; 281: 20283-90.
  74. Denis M, Haidar B, Marcil M, Bouvier M, Krimbou L, Genest J. Characterization of oligomeric human ATP binding cassette transporter A1. Potential implications for determining the structure of nascent high density lipoprotein particles. *J Biol Chem.* 2004; 279: 529-36.
  75. Schmitz G, Langmann T. Transcriptional regulatory networks in lipid metabolism control ABCA1 expression. *Biochim Biophys Acta.* 2005; 1735:1-19.
  76. Repa JJ, Mangelsdorf DJ. Nuclear receptor regulation of cholesterol and bile acid metabolism. *Curr Opin Biotechnol.* 1999; 10:557-63.
  77. Wang Y, Oram JF. Unsaturated fatty acids inhibit cholesterol efflux from macrophages by increasing degradation of ATP-binding cassette transporter A1. *J Biol Chem.* 2002; 277:5692-7.
  78. Wang N, Chen W, Linsel-Nitsche P, Martinez LO, Agerholm-Laren B, Silver DL, Tall AR. A PEST sequence in ABCA1 regulates degradation by calpain protease and stabilization of ABCA1 by apoA1. *J Clin Invest.* 2003; 111:99-107.
  79. Gaziano JM, Buring JE, Breslow JL et al. Moderate alcohol intake, increased levels of high-density lipoprotein and its subfractions, and decreased risk of myocardial infarction. *N Engl J Med.* 1993; 329:1829–1834.
  80. Slatter TL, Williams MJ, Frikke-Schmidt R, Tybjaerg- Hansen A, Morison IM,

- McCormick SP. Promoter haplotype of a new ABCA1 mutant influences expression of familial hypoalphalipoproteinemia. *Atherosclerosis*. 2006; 187:393–400.
81. Probst MC, Thumann H, Aslanidis C, Langmann T, Buechler C, Pastsch W, Beralle FE, Dallinga-Thie GM, Geisel J, Keller C, Menys VC, Schmitz G. Screening for functional sequence variations and mutations in ABCA1. *Atherosclerosis* 2004; 175(4): 269–279.
  82. Frikke-Schmidt R, Nordestgaard BG, Jensen GB, Tybjaerg-Hansen A. Genetic variation in ABC transporter A1 contributes to HDL cholesterol in the general population. *J Clin Invest*. 2004; 114:1343–1353.
  83. Cohen JC, Kiss RS, Pertsemlidis A, Marcel YL, McPherson R, Hobbs HH. Multiple rare alleles contribute to low plasma levels of HDL cholesterol. *Science*. 2004; 305:869–872.
  84. Harada T, Imai Y, Nojiri T, Morita H, Hayashi D, Maemura K, Fukino K, Kawanami D, Nishimura G, Tsushima K, Monzen K, Yamazaki T, Mitsuyama S, Shintani T, Watanabe N, Seto K, Sugiyama T, Nakamura F, Ohno M, Hirata Y, Yamazaki T, Nagai R. A common Ile 823 Met variant of ATP-binding cassette transporter A1 gene (ABCA1) alters high density lipoprotein cholesterol level in Japanese population. *Atherosclerosis*. 2003; 169: 105–112.
  85. Brunham LR, Singaraja RR, Pape TD, Kejariwal A, Thomas PD, Hayden MR. Accurate prediction of the functional significance of single nucleotide polymorphisms and mutations in the ABCA1 gene. *PloS genetics*. 2005; 1:739-47.
  86. Kiriakou T, Pontefract DE, Viturro E, Hodgkinson CP, Laxton RC, Bogari N, Cooper G, Davies M, Giblett J, Day IN, Simpson IA, Albrecht C, Ye S. Functional polymorphism in ABCA1 influences age of symptom onset in coronary artery disease patients. *Hum Mol Genet*. 2007; 16:1412-22.
  87. Wang J, Burnett JR, Near S, Young K, Zinman B, Hanley AJG, Connelly PW, Harris SB, Hegele RA. Common and rare ABCA1 variants affecting plasma HDL cholesterol. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2000 ; 20:1983-9.
  88. Villareal-Moreno MT, Aguilar-Salinas CA, Rodríguez-Cruz M, Riaño D, Villalobos-Comparan M, Coral-Vazquez R, Menjivar M, Yescas-Gomez P,

- Königsoerg-Fainstein M, Romero-Hidalgo S, Tusié-Luna MT, Canizales-Quinteros S, and the Metabolic Study Group. The ATP-Binding Cassette Transpoter A1 R230C Variant Affects HDL Cholesterol levels and BMI in the Mexican Population. Association With obesity and Obesity Related Comorbidities. *Diabetes*. 2007; 56:1881-1887.
89. Aguilar-Salinas CA, Cruz-Bautista I, Mehta R, Villarreal-Molina MT, Pérez FJG, Tusie-Luna MT, Canizales-Quinteros S. The ATP-binding Cassette Transporter Subfamily A Member 1 (ABC-A1) and Type 2 Diabetes: An Association Beyond HDL Cholesterol. *Curr Diabetes Rev*. 2007; 3:264-267.
90. Villarreal-Molina MT, Flores-Dorantes MT, Arellano-Campos O, Villalobos-Comparan M, Rodríguez-Cruz M, Miliar-García A, Huertas-Vazquez A, Menjivar M, Romero-Hidalgo S, Wachter NH, Tusié-Luna MT, Cruz M, Aguilar-Salinas CA, Canizales-Quinteros S, and the Metabolic Study Group. Association of the ATP-Binding Cassette Transporter A1 R230C Variant With Early-Onset Type 2 Diabetes in a Mexican Population. *Diabetes*. 2008; 57:509-513.
91. Kyriakou T, Hodgkinson C, Pontefract DE, Iyengar S, Howell WM, Wong Y, Eriksson P, Ye S. Genotypic Effect of the -565C>T Polymorphism in the ABCA1 Gene Promoter on ABCA1 Expression and Severity of Atherosclerosis. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2005; 25:418-423.
92. Bouchard C, Tremblay A, Despres JP, Nadeau A, Lupien PJ, Theriault G, Dussault J, Moorjani S, Pinault, Fournier G. The response to long-term overfeeding in identical twins. *N Engl J Med*. 1990; 322:1477-1482
93. Turula M, Kaprio J, Rissanen A, Koskenvuo M. Body weight in the Finish Twin Cohort. *Diabetes Res Clin Pract*. 1990; 10(1): S33-36.
94. Yang W, Kelly T, He J: Genetic epidemiology of obesity. *Epidemiol Rev*. 2007; 29:49-61.
95. Damcott CM, Sack P, Shuldiner AR. The genetics of obesity. *Endocrinol Metab Clin North AM*. 2003; 32:S2111-214.
96. Neel JV. Diabetes Mellitus: A "Thirfty" Genotype redered detrimental by "Progress"? *Am J Hum Genet*. 1962; 14(4):353-362.
97. Freeman H, Cox RD. Type-2 Diabetes: A Cocktail of Genetic Discovery. *Hum Mol Genet*. 2006; 15(2):R202-9.

98. Iniesta R, Guinó E, Moreno V. Análisis estadístico de polimorfismos genéticos en estudios epidemiológicos. *Gac Sanit.* 2005; 19:333-349.
99. Yan WL, Gu DF. Issues on association studies on complex diseases. *Yi Chuan Xue Bao.* 2004; 31:533-537.
100. Santos J, Martínez J, Pérez F, Abala C. Epidemiología genética de la obesidad: Estudios familiares. *Rev Méd Chile.* 2005; 133:349-341.
101. Hinney A, Vogel CIG, Hebebrand J. From monogenic to polygenic obesity: recent advances. *Eur Child Adolesc Psychiatry.* 2010; 19:297-310.
102. Farooqi IS, Jebb SA, Langmack G, Lawrence E, Cheetham CH, Prentice AM, Hughes IA, McCamish MA, O'Rahilly S. Effects of recombinant leptin therapy in a child with congenital leptin deficiency. *N Engl J Med.* 1999; 341:879–884.
103. Farooqi IS, O'Rahilly S. Monogenic obesity in humans. *Annu Rev Med.* 2005; 56:443–458
104. Farooqi IS. Monogenic human obesity syndromes. *Prog Brain Res.* 2006; 153:119–125
105. Cummings DE, Schwartz MW. Genetics and pathophysiology of human obesity. *Annu Rev Med.* 2003; 54:453–471.
106. Farooqi IS, Keogh JM, Yeo GS, Lank EJ, Cheetham T, O'Rahilly S. Clinical spectrum of obesity and mutations in the melanocortin 4 receptor gene. *N Engl J Med.* 2003; 348:1085–1095.
107. Mencarelli M, Walker GE, Maestrini S, Alberti L, Verti B, Brunani A, Petroni ML, Tagliaferri M, Liuzzi A, Di Blasio AM. Sporadic mutations in melanocortin receptor 3 in morbid obese individuals. *Eur J of Hum Genet.* 2008; 16:581-586.
108. Perry JR, Frayling TM. New Gene Variants Alter Type 2 Diabetes Risk Predominantly through Reduced Beta-Cell Function. *Curr Opin Clin Nutr Metab Care.* 2008; 11:371-7.
109. Dina C, Meyre D, Gallina S, Durand E, Korner A, Jacobson P, Carlsson LM, Kiess W, Vatin V, Lecoœur C, Delplanque J, Vaillant E, Pattou F, Ruiz J, Weill J, Levy-Marchal C, Horber F, Potoczna N, Hercberg S, Le Stunff C, Bougnères P, Kovacs P, Marre M, Balkau B, Cauchi S, Chèvre JC, Froguel P. Variation in FTO contributes to childhood obesity and severe adult obesity. *Nat Genet.* 2007; 39(6): 724–726.



110. Frayling TM, Timpson NJ, Weedon MN, Zeggini E, Freathy RM, Lindgren CM, Perry JR, Elliott KS, Lango H, Rayner NW, Shields B, Harries LW, Barrett JC, Ellard S, Groves CJ, Knight B, Patch AM, Ness AR, Ebrahim S, Lawlor DA, Ring SM, Ben-Shlomo Y, Jarvelin MR, Sovio U, Bennett AJ, Melzer D, Ferrucci L, Loos RJ, Barroso I, Wareham NJ, Karpe F, Owen KR, Cardon LR, Walker M, Hitman GA, Palmer CN, Doney AS, Morris AD, Smith GD, Hattersley AT, McCarthy MI. A common variant in the FTO gene is associated with body mass index and predisposes to childhood and adult obesity. *Science*. 2007; 316:889–894.
111. Scuteri A, Sanna S, Chen WM, Uda M, Albai G, Strait J, Najjar S, Nagaraja R, Orru M, Usala G, Dei M, Lai S, Maschio A, Busonero F, Mulas A, Ehret GB, Fink AA, Weder AB, Cooper RS, Galan P, Chakravarti A, Shlessinger D, Cao A, Lakatta E, Abecasis GR. Genome-wide association scan shows genetic variants in the FTO gene are associated with obesity-related traits. *PLoS Genet*. 2007;3(7): e115.
112. Manolio TA, Collins FS, Cox NJ, Goldstein DB, Hindorff LA, Hunter DJ, McCarthy MI, Ramos EM, Cardon LR, Chakravarti A, Cho JH, Guttmacher AE, Kong A, Kruglyak L, Mardis E, Rotimi CN, Slatkin M, Valle D, Whittemore AS, Boehnke M, Clark AG, Eichler EE, Gibson G, Haines JL, Mackay TF, McCarroll SA, Visscher PM. Finding the missing heritability of complex diseases. *Nature*. 2009; 461:747–753.
113. Walters RG, Jacquemont S, Valsesia A, de Smith AJ, Martinet D, Andersson J, Falchi M, Chen F, Andrieux J, Lobbens Delobel B, Stutzmann F, El-Sayed Moustafa JS, Chèvre JC, Lecoeur C, Vatin V, Bouquillon S, Buxton JL, Boute O, Holder-Espinasse M, Cusset JM, Lemaitre MP, Ambresin AE, Brioshi A, Gaillard M, Giusti V, Fellmann F, Ferrarini A, Hadjikhani N, Champion D, Guilmatre A, Goldenberg A, Calmels N, Mandel JL, Le Caignec C, David A, Isidor B, Cordier MP, Dupuis-Girod S, Labalme A, Sanlaville D, Béri-Deixheimer M, Jonveaux P, Leheup B, Öunap K, Bochukova EG, Henning E, Keog J, Ellis JR, MacDermot KD, Vincent-Delorme C, Plessis G, Touraine R, Philippe A, Malan V, Mathieu-Dramard M, Chiesa J, Blaumeiser B, Kooy RF, Caiazzo R, Pigeyre M, Balkau B, Sladek R, Bergmann S, Mooser V,

- Waterworth D, Reymond A, Vollenweider P, Waeber G, Kurg A, Palta P, Esko T, Metspalu A, Nelis M, Elliott P, Hartikainen AL, McCarthy MI, Peltonen L, Carlsson L, Jacobson Sjöström L, Huang N, Hurles ME, O’Rahilly S, Farooqi IS, Männik K, Jarvelin MR, Pattou F, Meyre D, Walley AJ, Coin LJM, Blakemore AIF, Froguel P, and Beckmann JS. A novel highly-penetrant form of obesity due to microdeletions on chromosome 16p11.2. *Nature*. 2010; 463(7281):671-675.
114. Florez JC, Manning AK, Dupuis J, McAteer J, Irenze K, Gianniny L, Mirel DB, Fox CS, Cupples LA, Meigs JB. A 100k Genome-Wide Association Scan for Diabetes and Related Traits in the Framingham Heart Study: Replication and Integration with Other Genome-Wide Datasets. *Diabetes*. 2007; 56:3063-74.
115. Tusié-Luna MT. Genes and Type 2 Diabetes Mellitus. *Arch Med Reserch*. 2005; 36:210-222.
116. Cox RD, Church CD. Mouse models and the interpretation of human GWAS in type 2 diabetes and obesity. *Dis Model Mech*. 2011; 4(2):155-164.
117. Gerken T, Girard CA, Tung YC, Webby CJ, Saudek V, Hewitson KS, Yeo GS, McDonough MA, Cunliffe S, McNeill LA, Galvanovskis J, Rorsman P, Robins P, Prieur X, Coll AP, Ma M, Jovanovic Z, Farooqi IS, Sedgwick B, Barroso I, Lindahl T, Ponting CP, Ashcroft FM, O’Rahilly S, Schofield CJ. The obesity-associated FTO gene encodes a 2-oxoglutarate-dependent nucleic acid demethylase. *Science*. 2007; 318:1469–1472.
118. Villalobos M, Flores M, Villarreal MT, Rodríguez M, García AC, Robles L, Huertas A, Saucedo N, López M, Sánchez F, Domínguez Aarón, Gutiérrez R, Menjivar M, Coral R, Hernández G, Vital VS, Acuña V, Romero S, Ruiz DG, Riaño D, Herrera MF, Gómez FJ, Froguel P, García E, Tusié MT, Aguilar CA, Canizales S. The FTO Gene is associated with adulthood obesity in the mexican population. *Obesity*. 2008; 16(10):2296-2301.
119. Freathy RM, Timpson NJ, Lawlor DA, Pouta A, Ben-Shlomo Y, Ruukonen A, Ebrahim S, Shields B, Zeggini E, Weedon MN, Lindgren CM, Lango H, Melzer D, Ferrucci L, Paolisso G, Neville MJ, Karpe F, Palmer CN, Morris AD, Elliott P, Jarvelin MR, Smith GD, McCarthy MI, Hattersley AT, Frayling TM. Common variation in the FTO gene alters diabetes-related metabolic traits to the extent

- expected given its effect on BMI. *Diabetes*. 2008;57(5):1419–1426.
120. Parra EJ, Cameron E, Simmonds L, Valladares A, McKeigue P, Shrive, M, Wacher N, Kumate J, Kittles R, Cruz M. Association of Tcf712 Polymorphisms with Type 2 Diabetes in Mexico City. *Clin Genet*. 2007; 71:359-66.
  121. Shyong-Tai E, Shanta CE, Chew SK, Tan BY, Tan CE. Isolated low HDL Cholesterol and insulin-resistant state only in the presence of fasting hypertriglyceridemia. *Diabetes*. 1999; 48:1088-1092.
  122. Le Lay S, Robichon C, Le Liepvre X, Dagher G, Ferre P, Dugail I. Regulation of ABCA1 expression and cholesterol efflux during adipose differentiation of 3T3-L1 cells. *J Lipid Res*. 2003; 44:499-507.
  123. Xu M, Zhou H, Wang J, Li C, Yu Y. The expression of ATP-binding cassette transporter A1 in Chinese overweight and obese patients. ABCA1 expression in obesity. *Inter J of Obesity*. 2009; 33:851-856.
  124. Wang X, Paigen B. Genome-wide search for new genes controlling plasma lipid concentrations in mice and humans. *Curr Opin Lipidol*. 2005; 16:127-137.
  125. Singaraja RR, Brunham LR, Vischer H, Kastelein JJP, Hayden MR. Efflux and atherosclerosis: The clinical and biochemical impact of variations in the ABCA1 gen. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2003; 23:720-727.
  126. Tabas I. Phospholipid metabolism in cholesterol-loaded macrophages. *Curr Opin lipidol*. 1997; 8:263-267.
  127. Tabas I. Consequences of cellular cholesterol accumulation: basic concepts and physiological implications. *J Clin Invest*. 2002; 110:905-911.
  128. Albrecht C, Simon-Vermont I, Elliott JI, Higgins CF, Johnston DG, Valabhji J. Leukocyte ABCA1 gene expression is associated with fasting glucose concentration in normoglycemic men. *Metabolism*. 2004; 53:17-21.
  129. Bonilla C, Parra EJ, Pfaff CL, Dios S, Marshall JA, Hamman RF, Ferrell RE, Hoggart CL, McKeigue PM, Shriver MD. Admixture in the Hispanics of San Luis Valley, Colorado, and its implications for complex trait gene mapping. *Ann Hum Genet*. 2004; 68:139-153.
  130. Choudhry S, Coyle NE, Tang H, Salari K, Lind D, Clark SL, Tsai HJ, Naqvi M, Phong A, Ing N, Matallana H, Avila PC, Casal J, Torres A, Nazario S, Castro R, Battle NC, Perez-Stable EJ, Kwok PY, Sheppard D, Shriver MD, Rodriguez-

- Clintron W, Risch N, Ziv E, Burchard EG. Genetic of Asthma in Latino Americans GALA Study. Population stratification confounds genetic association studies among Latinos. *Hum Genet.* 2006; 118:652-664.
131. Cossrow N, Falkner B. Race/ethnic issues in obesity and obesity-related comorbidities. *J Clin Endocrinol Metab.* 2004; 89:2590-4.
132. Lorenzo C, Serrano-Rios M, Martinez-Iarrad MT, Gabriel R, Williams K, Gonzalez-Villalpando C, Stern MP, Hazuda HP, Haffner SM. Was the historic contribution of Spain to the Mexican gene pool partially responsible for the higher prevalence of type 2 diabetes in Mexican origin populations? The Spanish Insulin Resistance Study Group, The San Antonio Heart Study and the Mexico City Diabetes Study. *Diabetes Care.* 2001; 24:2059-2064.
133. Watson JD, Crick FH. Molecular structure of nucleic acids: a structure for deoxyribose nucleic acid. *Nature.* 1953: 4356.