



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE
MÉXICO**

FACULTAD DE QUÍMICA

**“Estudio del gen *VNN1* y su asociación a rasgos
metabólicos en población adolescente”**

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE
QUÍMICO FARMACÉUTICO BIÓLOGO

PRESENTA

PABLO IVÁN AGUAYO DE LA ROSA



MÉXICO, D.F.

Junio 2012



Universidad Nacional
Autónoma de México



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: Profesor: **Marisol López López**

VOCAL: Profesor: **Francisco Javier Plasencia de la Parra**

SECRETARIO: Profesor: **Samuel Canizales Quinteros**

1er. SUPLENTE: Profesor: **Euclides Ávila Chávez**

2° SUPLENTE: Profesor: **Guillermo Celestino Cardoso Saldaña**

Sitio donde se desarrolló el tema

**LABORATORIO 3, UNIDAD DE BIOLOGÍA MOLECULAR Y
MEDICINA GENÓMICA, INSTITUTO NACIONAL DE CIENCIAS
MÉDICAS Y NUTRICIÓN “SALVADOR ZUBIRÁN”/FACULTAD DE
QUÍMICA, UNAM**

ASESOR DEL TEMA:

Samuel Canizales Quinteros

SUPERVISOR TÉCNICO:

Leonor Jacobo Albavera

SUSTENTANTE:

Pablo Iván Aguayo de la Rosa

Índice

Resumen	1
Introducción	2
Epidemiología.....	2
Comorbilidades asociadas a la hipoalfalipoproteinemia	3
Transporte de colesterol, función de las HDL.....	4
Factores genéticos y ambientales.....	9
Análisis de expresión, polimorfismos, escaneos completos del genoma.....	9
El gen <i>VNN1</i> y su proteína.....	13
Planteamiento del problema	15
Objetivo	15
Hipótesis	15
Diseño experimental	15
Materiales y métodos	17
Sujetos de estudio	17
Caracterización Bioquímica y Antropométrica.....	18
Extracción de DNA.....	19

Genotipificación de la variante G-137T.....	19
Extracción de RNA de leucocitos a partir de sangre periférica.....	20
Tratamiento con DNasa.....	21
Cuantificación espectrofotométrica del RNA y DNA.....	22
Electroforesis gel de Agarosa.....	22
Síntesis de cDNA.....	22
Ensayos de expresión con PCR en tiempo real.....	23
Análisis estadístico.....	24
Resultados	25
Variante G-137T y su asociación con los niveles de expresión de <i>VNN1</i>	28
Discusión y conclusiones	32
Epidemiología.....	32
Expresión de <i>VNN1</i> y niveles de C-HDL.....	32
Polimorfismo G-137T y expresión de <i>VNN1</i>	33
Polimorfismo-fenotipo.....	34
Referencias	36
Apéndices	40
Apéndice I: Carta Informativa.....	40
Apéndice II: Carta de Consentimiento Informado.....	43
Apéndice III: Cuestionario para padres Convivencia Infantil.....	44

Apéndice IV: Cuestionario Actividad Física.....	47
Apéndice V: Cuestionario Tanner.....	49
Apéndice VI Artículo: <i>VNN1</i> gene Expression Levels and the G-137T polymorphism are associated with HDL-C levels and Body mass Index in Mexican Prepubertal Children.....	50

Abreviaturas

OMS: Organización Mundial de la Salud

HDL: Lipoproteínas de alta densidad

C-HDL: Colesterol asociado a lipoproteínas de a alta densidad

Apo A1: Apolipoproteína A1

IMC: Índice de masa corporal

VLDL: Lipoproteínas de muy baja densidad

IDL: Lipoproteínas de densidad intermedia

LDL: Lipoproteínas de baja densidad

CETP: Proteína transferidora de ésteres de colesterol

ABCA1: Casete de unión a ATP A1

SR-B1: Receptor tipo basurero B1

SNP: Polimorfismo de un solo nucleótido

GWAS: Escaneos completos del genoma

CT: Colesterol total

TG: Triglicéridos

Se agradece atentamente al **CONACyT** y a la **CCINSHAE** por el apoyo económico brindado como parte del proyecto con **clave 85010** titulado “**Identificación de genes asociados a la variación de los niveles plasmáticos de lipoproteínas de alta densidad a través del análisis de expresión génica**”, a cargo del **Dr. Samuel Canizales Quinteros**

Resumen

La hipoalfalipoproteinemia caracterizada por niveles séricos bajos de colesterol-HDL (C-HDL) es la dislipidemia más prevalente en población mexicana. Esta dislipidemia es uno de los principales factores de riesgo para el desarrollo de las enfermedades cardiovasculares, las cuales representan la principal casusa de muerte en el mundo. A pesar de que se sabe que los factores genéticos explican más del 50% de la regulación de los niveles de C-HDL, poco se sabe de la regulación de estas lipoproteínas a través de la expresión génica. En un estudio de expresión génica global realizado en población adulta de origen mexicano se encontró una correlación positiva entre los niveles de expresión del gen vanina 1 (*VNN1*, el cual codifica para una proteína con actividad de panteteinasa) y los niveles séricos de C-HDL. Sin embargo, no se tienen reportes que confirmen la participación del gen *VNN1* en la modulación de los niveles de C-HDL y/o otros rasgos metabólicos. Por ello, el objetivo de este estudio fue evaluar la posible correlación entre la expresión del gen Vanina1 (*VNN1*) y la variante G-137T (rs4897612) con los niveles plasmáticos de C-HDL y otros rasgos metabólicos en población adolescente mexicana. Se realizó un estudio de tipo transversal, se midieron parámetros bioquímicos y antropométricos en 120 adolescentes. La variante rs4897612 (G-137T) se genotipificó a través de ensayos tipo TaqMan y se determinaron los niveles de expresión en leucocitos del gen *VNN1*. Se evaluó la correlación entre los niveles de RNAm de *VNN1* y distintos parámetros bioquímicos, incluyendo los niveles de C-HDL, así como la asociación de estos parámetros con polimorfismo G-137T. Los resultados obtenidos no mostraron correlación y/o asociación entre *VNN1* y los niveles del C-HDL. Sin embargo, se observó una correlación positiva entre los niveles de expresión de *VNN1* y el z-score del índice de masa corporal (IMC) ($r=0.298$, $P=0.049$) solamente en el grupo de niñas. De igual manera, el genotipo TT se asoció con un menor z-score del IMC en el ($\beta=-1.985$, $P=0.013$) en las niñas. En conclusión, los resultados obtenidos sugieren que *VNN1* modula la variación del IMC en la muestra de población adolescente analizada.

Introducción

Epidemiología del C-HDL

De acuerdo con la OMS las enfermedades cardiovasculares son la principal causa de muerte en el mundo, afectando por igual a ambos sexos; más del 80% se producen en países con ingresos bajos y medios. Los principales factores de riesgo son el aumento de la tensión arterial, la obesidad y sobrepeso, niveles elevados de glucosa en sangre y las dislipidemias (OMS, 2011). La hipoalfalipoproteinemia es la alteración metabólica en el perfil lipídico más común en población mexicana, caracterizada por la presencia de niveles bajos de colesterol asociado a lipoproteínas de alta densidad (C-HDL, *High Density Lipoprotein-Cholesterol*). Por convención niveles de C-HDL menores a 35 mg/dL en hombres y menores a 45 mg/dL en mujeres han sido establecidos como valor de riesgo (von Eckardstein y cols., 2001). La hipoalfalipoproteinemia constituye una de las más importantes comorbilidades de la obesidad, un grave problema de salud pública en México que no solo es observable en adultos, sino que se presenta desde edades tempranas; en individuos de entre 10 y 20 años de edad se han observado estrías y vetas de grasa en la aorta y en las arterias coronarias (Tudela, 2008). En un estudio realizado en adultos mexicanos se encontró que la prevalencia de la hipoalfalipoproteinemia es del 50% en los adultos, seguida de la hipertrigliceridemia con 24.3% (Aguilar-Salinas y cols., 2001). Por otra parte, Posadas-Sánchez y colaboradores realizaron un estudio transversal en adolescentes de escuelas de la delegación Coyoacán encontrando que, de igual manera, la dislipidemia más frecuente es la presencia de niveles bajos de C-HDL, y en segundo lugar niveles elevados de triglicéridos (TG). Un incremento del índice de masa corporal (IMC) se ha asociado a niveles bajos de C-HDL acompañados de hipertrigliceridemia (Posadas-Sánchez y cols., 2007).

Comorbilidades asociadas a la hipoalfalipoproteinemia

Diversos estudios epidemiológicos, farmacológicos y en modelos animales han mostrado que las concentraciones anormales de lípidos y lipoproteínas en plasma favorecen el desarrollo y la evolución de la aterosclerosis (Grundy y cols., 1999). De particular interés ha sido la relación inversa que existe entre los niveles plasmáticos de colesterol transportado por las lipoproteínas de alta densidad (HDL) y el riesgo de cardiopatía isquémica aterosclerosa, siendo los niveles bajos de C-HDL uno de los principales factores de riesgo para esta patología (von Eckardstein y cols., 2001). La hipoalfalipoproteinemia está presente en más del 40% de los pacientes con infarto del miocardio y es una característica frecuente en pacientes con diabetes o síndrome metabólico, condiciones asociadas a un riesgo cardiovascular aumentado (Taskinen, 2003). Este riesgo depende a su vez de la presencia de factores de riesgo adicionales; por este motivo podemos considerar que los valores de riesgo son mayores en individuos con diabetes tipo 2 o con factores de riesgo múltiples. Los valores de C-HDL han cobrado importancia en la evaluación de riesgo cardiovascular global y como blanco terapéutico en el tratamiento de enfermedades cardiovasculares (von Eckardstein y cols., 2001).

El síndrome metabólico ha sido definido como un conjunto de factores que predisponen al desarrollo de diabetes tipo 2 o enfermedad cardiovascular. Diversas organizaciones han establecido criterios para diagnosticarlo: Organización Mundial de la Salud (OMS) en 1998, el Grupo Europeo para el Estudio de la Resistencia a la Insulina (EGIR, *European Group for the Study of Insulin Resistance*) en 1999, el Programa Nacional del Colesterol (NCEP, *National Cholesterol Program*) en 2001 y por la Fundación Internacional de la Diabetes (IDF, *International Diabetes Foundation*) en 2005 (Tabla 1). Sin embargo, el principal objetivo del diagnóstico del síndrome metabólico es identificar a individuos con riesgo de desarrollar enfermedad cardiovascular o de desarrollar diabetes tipo 2, por esto, uno de los criterios que se ha mantenido

para el síndrome metabólico en las diferentes definiciones ha sido la presencia de niveles bajos de C-HDL, es decir $<0.35\text{mg/dL}$ en hombres y $<0.39\text{ mg/dL}$ en mujeres, según la OMS (Bauduceau y cols., 2007).

Tabla 1. Criterios establecidos para definir síndrome metabólico en población infantil

Criterios	Valores para individuos de 10 a 16 años de edad
Definición de adiposidad	CC \geq percentila 90
Metabolismo de glucosa	Glucosa en ayuno $\geq 100\text{mg/dL}$
Dislipidemia	TG $\geq 150\text{mg/dL}$ o C-HDL $\geq 40\text{mg/dL}$ o que tome medicamentos para disminuir los lípidos
Hipertensión arterial	PAD ≥ 130 o PAS $\geq 85\text{mg/dL}$ o que tome algún antihipertensivo

CC: circunferencia de cintura; TG: Triglicéridos; C-HDL: Colesterol HDL; PAD: presión arterial diastólica; PAS: presión arterial sistólica (Zimmet y cols., 2007)

Transporte del colesterol, función de las HDL

En el plasma, los lípidos son transportados como lipoproteínas, que están constituidos por ésteres de colesterol y triglicéridos en el núcleo hidrofóbico y por colesterol libre, fosfolípidos y apolipoproteínas en la superficie hidrofílica. Las lipoproteínas plasmáticas se subdividen de manera general en cinco clases de acuerdo a su densidad, tamaño y composición como se describe en la tabla 2.

Tabla 2. Clasificación de las lipoproteínas plasmáticas

Lipoproteína	Lípidos principales	Apoproteínas	Densidad (g/cm ³)	Diámetro (Å)
Quilomicrón	Triglicéridos y colesterol de la dieta	A-I, A-II, B-48, C-I, C-II, C-III y E	<0.95	5000-800
VLDL	Triglicéridos endógenos, ésteres de colesterol y colesterol	B-100, C-I, C-II, C-III y E	0.95-1.006	800-300
IDL	Ésteres de colesterol, colesterol y triglicéridos	B-100, C-III y E	1.006-1.019	350-250
LDL	Ésteres de colesterol, colesterol y triglicéridos	B-100	1.019-1.063	280-180
HDL	Ésteres de colesterol, colesterol	A-I, A-II, C-I, C-III, D y E	1.063-1.210	120-50

(Tudela, 2008)

Los quilomicrones se forman postprandialmente a partir de lípidos provenientes de la dieta en células del epitelio intestinal y entran a la circulación a través de los vasos sanguíneos del mesenterio. En la sangre, los triglicéridos son hidrolizados a ácidos grasos por la lipoprotein-lipasa depositando sus lípidos en músculos (para usarse como energía) y en tejido adiposo (donde se almacenan). La partícula resultante, el remanente de quilomicrón, regresa al hígado donde es degradado y los lípidos resultantes, junto con la producción endógena de colesterol y triglicéridos, forman las lipoproteínas de muy baja densidad (VLDL, *Very Low-Density Lipoprotein*). Al igual que los quilomicrones,

las VLDL transportan y depositan en músculo y tejido adiposo sus triglicéridos disminuyendo su tamaño hasta transformarse en lipoproteínas de densidad intermedia (IDL, *Intermediate-Density Lipoprotein*) para la posterior pérdida de apoproteínas (E y C-III) y la subsecuente formación de lipoproteínas de baja densidad (LDL, *Low-Density Lipoprotein*). La LDL, que contiene en mayor proporción ésteres de colesterol, se encargan del transporte de colesterol a tejidos periféricos. Durante el transporte, las LDL, pueden depositarse en paredes arteriales y ser oxidadas por radicales libres de oxígeno, lo que provoca la formación de placas ateromatosas (Lindbom, 2000; Tudela, 2008).

Las HDL están constituidas por una parte proteica y una parte lipídica; se caracterizan por su alta densidad y tamaño pequeño. Las apolipoproteínas principales en la estructura de la HDL son la apolipoproteína AI (Apo A-I), que ocupa hasta el 70% de la totalidad de la parte proteica y se sintetiza en hígado e intestino y la Apo A-II, que representa cerca del 20% y se sintetiza sólo en hígado. Mediante electroforesis en gel por gradiente, las HDL se pueden separar en 5 subpoblaciones que difieren en tamaño, composición y función: HDL 2b, 2a, 3a, 3b, 3c, siendo 2b la más grande y 3c la más pequeña (Taskinen, 2003). La formación y maduración de las HDL₃ y HDL₂ es un proceso complejo que se lleva a cabo a partir de Apo A-I libre de colesterol y/o a partir de pre-β₁-HDL como precursores (Rader, 2006). La proteína CETP (*Cholesteryl ester transfer protein*) que transfiere de ésteres de colesterol, media la transferencia de ésteres de colesterol de VLDL y LDL a HDL₂ maduras.

La presencia de niveles elevados de C-HDL se ha correlacionado con una disminución del riesgo a presentar enfermedades cardiovasculares; en particular tienen un papel importante en la protección contra el desarrollo de aterosclerosis (McPherson, 2007). Una de las acciones protectoras de las HDL es actuar como aceptor de colesterol de células periféricas incluyendo células espumosas presentes en las arterias. El transporte reverso del colesterol (TRC) media el eflujo de fosfolípidos y colesterol a Apo A-I, con esto facilita el regreso de colesterol al hígado para su excreción a través de la bilis y las heces (Rader,

2006). El colesterol libre extraído de tejidos periféricos es esterificado en las HDL por la lecitin colesterol aciltransferasa (LCAT);posteriormente, CETP se encarga del transporte de ésteres de colesterol pero esta vez desde las HDL hacia las VLDL y LDL, mientras que las lipasas hepática y endotelial actúan sobre las HDL maduras regenerando así Apo A-I con bajo contenido en lípidos, listas para adquirir lípidos y formar nuevamente HDL maduras (von Eckardstein y cols., 2001, Rader, 2006).

El eflujo de colesterol desde los macrófagos se lleva a cabo a través de diferentes vías. Una de las vías, es a través de la proteína transmembranal A1 (ABCA1, *ATP-binding cassette transporter A1*) que permite que el colesterol libre, esterificado por la LCAT, sea transportado a Apo A-I bajas en lípidos resultando en la formación de HDL discoidales que luego de adquirir más colesterol esterificado (hidrofóbico y por lo tanto almacenado en su centro) alcanzan su forma esférica. Otra de las vías por las cuales el colesterol libre proveniente de macrófagos es esterificado y transportado es a través de la proteína transmembranal G1 (ABCG1, *ATP-binding cassette transporter G1*), que lo transporta directamente a HDL maduras (figura 1). Además de participar en el eflujo del colesterol, se han descrito otras propiedades potencialmente antiinflamatorias y antiaterogénicas para las HDL como la inhibición de la oxidación de LDL, inhibición de la inflamación endotelial (Medina-Urrutia, 2008), promueven la producción de óxido nítrico endotelial e inhiben la agregación plaquetaria y la coagulación. (Barter, 2011)

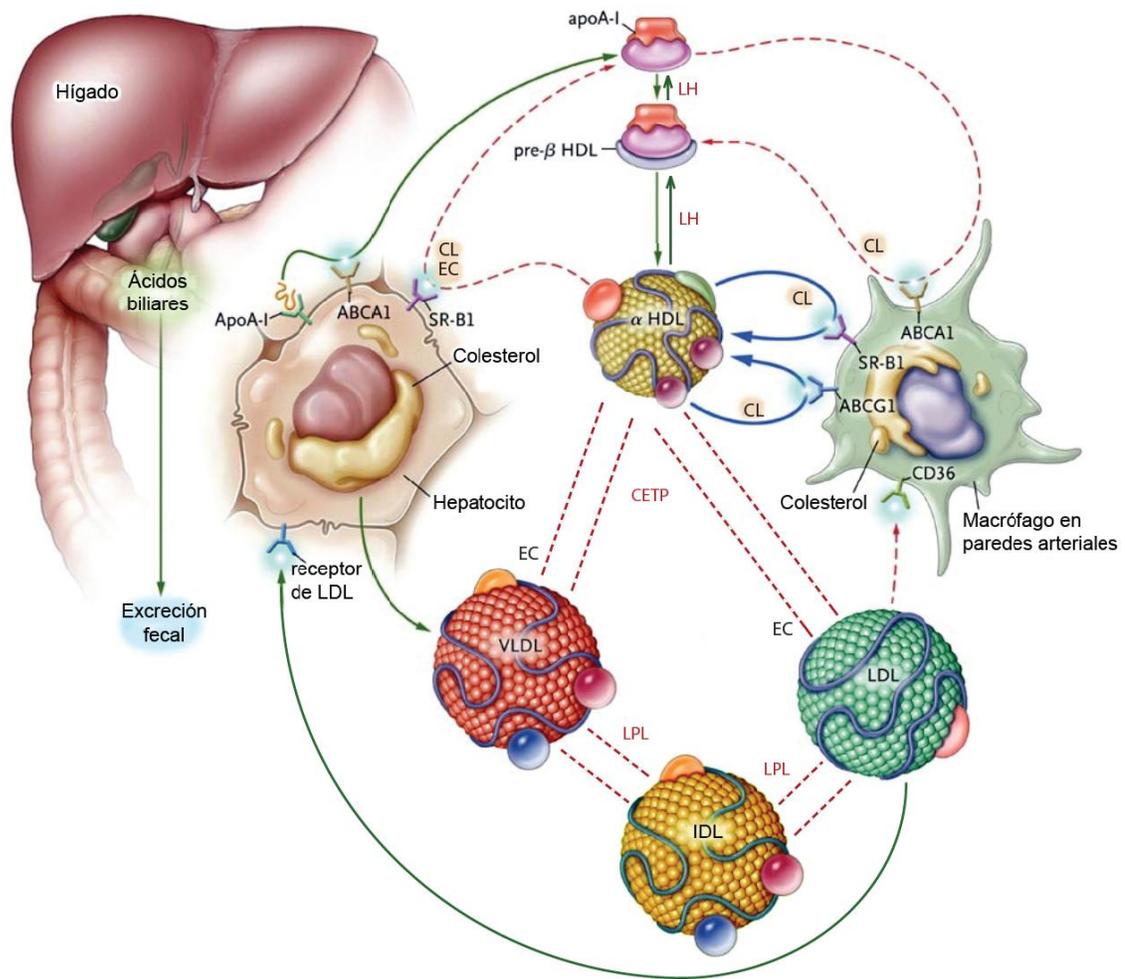


Figura 1. Representación esquemática del transporte reverso del colesterol. Apo A-I es secretada del hepatocito como una proteína con poca cantidad de lípidos e interactúa con ABCA1 en macrófagos removiendo colesterol libre intracelular hasta tomar forma esférica de HDL madura. La partícula de HDL madura participa en el transporte reverso del colesterol interactuando con el receptor tipo basurero B1 (SR-B1, *Scavenger receptor class B member 1*) en el hígado y potencialmente regenerando HDL discoidales bajas en lípidos. A su vez interactúa con el receptor SR-B1 presente en macrófagos de donde toma colesterol libre. CETP transfiere ésteres de colesterol de HDL maduras a VLDL y LDL. CL, colesterol libre; EC, ésteres de colesterol. (Modificado de Taskinen, 2003)

Factores genéticos y ambientales

La regulación de los niveles plasmáticos de C-HDL es un proceso complejo en el que se deben considerar factores ambientales que pueden aumentar o disminuir los valores de C-HDL. Factores que disminuyen los niveles de C-HDL pueden ser; una dieta alta en carbohidratos y/o grasas, el uso de tabaco y un estilo de vida sedentario (Tall, 1990). Se ha demostrado, en estudios realizados con diferentes poblaciones sometidas a programas de entrenamiento, que la actividad física promueve un aumento significativo en los niveles de C-HDL (Pil-Byung y cols. 2011, Sheikholeslami Vatani y cols. 2011). Por otro lado en un estudio se asoció la temperatura ambiental con los niveles de C-HDL, encontrándose que frente a un incremento de la temperatura media ambiental, los niveles de C-HDL se ven disminuidos (Halonen y cols., 2011).

Estudios en gemelos han mostrado que los factores genéticos explican desde un 50% hasta un 62% de la variación de los niveles de C-HDL (Goode y cols., 2007). Algunos genes estudiados en humanos que codifican para proteínas esenciales para la síntesis de HDL son los genes de *APOAI*, *LCAT*, *ABCA1*; la ausencia de éstos causa deficiencia severa en los niveles de HDL. Como se mencionó anteriormente, la anormalidad lipídica más prevalente en la población mexicana es la hipoalfalipoproteinemia; esta prevalencia es una de las más altas reportadas hasta el momento a nivel mundial, por lo cual es de gran relevancia identificar los factores genéticos que pueden influir en la modulación de los niveles de C-HDL en nuestra población.

Análisis de expresión, polimorfismos, escaneos del genoma completo

Los polimorfismos de un solo nucleótido (SNPs, *single-nucleotide polymorphism*) son el tipo de variación genética más común a lo largo del genoma humano, el 90% de la variación genética del genoma humano se

encuentra en forma de SNP. Por definición, para considerar SNP a una variación dentro del genoma, debe estar presente en al menos 1% de la población. A pesar de que la similitud entre secuencias del genoma humano es de 99%, las pequeñas variaciones en el DNA pueden tener un mayor impacto sobre la respuesta a enfermedades (SNP Fact Sheet, 2008). La presencia de SNPs a lo largo del genoma los hace ideales para el estudio de poblaciones, especiación y demografía (Brumfield y cols., 2003); esto debido a que se originan en individuos, se heredan y se conservan generando grandes poblaciones que los presentan a través del tiempo, caracterizándolas y haciéndolas más susceptibles o resistentes a ciertas enfermedades.

Existen diversas técnicas que permiten el estudio genético de las enfermedades, entre ellas podemos mencionar análisis de genes candidato por asociación o por secuenciación, estudios de escaneo del genoma completo por asociación (GWAS, *genome-wide association study*), análisis de ligamiento y análisis de expresión génica. Los análisis de ligamiento buscan la co-segregación de una región cromosómica y un rasgo de interés usando marcadores polimórficos, éstos han resultado útiles principalmente en localización de genes responsables de enfermedades monogénicas, tal es el caso de la enfermedad de Tangier, caracterizada por niveles extremadamente bajos de HDL y Apo A-I debido a mutaciones que causan pérdida de función en el gen *ABCA1*. No obstante, los análisis de ligamiento sugieren que muchos loci contribuyen a la regulación de los niveles de C-HDL y que a su vez los efectos de la mayoría de los genes implicados son demasiado pequeños para ser detectados por estudios heterogéneos e independientes. El estudio de familias permite la determinación del origen parental y la cosegregación de la variante facilitando la detección de variantes raras, que tienen un papel importante en la regulación poligénica de niveles bajos de C-HDL (Weissglas-Volkov y Pajukanta, 2010).

Para el estudio de genes candidato por asociación o a través de la resecuenciación los genes son seleccionados ya sea por su localización en una

región o basándose en alguna otra evidencia de un posible papel del gen en la etiología de la enfermedad. La secuenciación de genes candidatos en estudios en busca de variantes en dos grupos de fenotipos extremos es el tipo de análisis más completo para identificar alelos. Sin embargo, estudios de resecuenciación de genes candidato han demostrado que las mutaciones raras en genes conocidos del metabolismo de C-HDL son frecuentes entre los casos de niveles bajos de C-HDL (. En los estudios de asociación, las frecuencias de los alelos o genotipos se comparan entre los casos y controles ya sea de población abierta o de familias. Los estudios de asociación son más eficientes que los análisis de ligamiento para la detección de efectos menores de variantes comunes. Algunos polimorfismos encontrados por estudios de asociación se ubican en los genes *CETP*, *LIPC*, *LPL*, *LCAT*, *ABCA1*, *APOA1* y *PON1*. Entre los genes con función conocida en el metabolismo de las HDL, *CETP*, *LPL* y *LIPC* han mostrado una fuerte asociación con los niveles de C-HDL (Weissglas-Volkov y Pajukanta, 2010).

En los GWAS se utilizan plataformas de gran escala (arreglos o chips) para genotipificar simultáneamente una gran cantidad de variantes o polimorfismos a lo largo del genoma y evaluar su contribución genética a la enfermedad o al rasgo cuantitativo. Los resultados provenientes de GWAS han confirmado que las variaciones dentro o cerca de genes, de los cuales ya se conocía su participación en el metabolismo de las HDL, contribuyen a la regulación de los niveles de C-HDL. La magnitud de los efectos genéticos es, sin embargo, pequeña; se estima que las variantes comunes encontradas explican, en conjunto, cerca del 25% de la variación en los niveles de C-HDL (Dumitrescu y cols., 2011). Sumado a esto, la mayoría de los escaneos del genoma completo han sido realizados en muestras de ancestría europea, sesgando los resultados. Estudios más recientes evaluaron si las variantes de riesgo encontradas con GWAS representaban riesgo para otras poblaciones como afroamericanos, mexicanos y japoneses. No todas las variantes replicaron, indicando que la contribución de cada locus a la susceptibilidad de la enfermedad varía y que la implicación de los SNPs a la salud pública difieren de acuerdo con las

poblaciones analizadas (Weissglas-Volkov y Pajukanta, 2010). Por este motivo es importante continuar buscando nuevas metodologías que permitan la detección de genes o variantes que participen en la modulación de los niveles de C-HDL.

La variación interindividual de los niveles de C-HDL, puede ser causada por la expresión diferencial de distintos genes. Poco se sabe del papel que tiene la expresión génica cuantitativa en el desarrollo de las dislipidemias en el humano, así como de las variantes genéticas que afectan dicha expresión. Los niveles de expresión génica son directamente modificados por polimorfismos en elementos de regulación y se pueden asignar como locus de rasgos cuantitativos de expresión (eQTLs, *Expression quantitative trait loci*). Los análisis de eQTLs evalúan los efectos de las variantes en el DNA como una medida de la expresión génica en una célula o tejido (Weissglas-Volkov y Pajukanta, 2010). Los análisis de expresión génica han revelado nuevos genes de susceptibilidad para las HDL, tal es el caso de un estudio en el cual se identificaron 60 genes asociados a la variación de los niveles de C-HDL a través del análisis completo del transcriptoma de linfocitos en población adulta mexico-americana (Göring y cols., 2007). En dicho estudio se reportó correlación altamente significativa entre la expresión del gen vanina 1 (*VNN1*) y los niveles de C-HDL. A su vez, se encontró la variante G-137T (rs4897612), estudiada en el presente trabajo, que corresponde a un cambio de una guanina por una timina en la posición 137 río arriba del gen *VNN1*, dentro de su promotor. A través de un ensayo de cambio en la movilidad electroforética (EMSA) se observó que cada alelo forma distintos complejos entre el DNA y factores de transcripción, es decir, estos complejos se forman de manera alelo-específica. Sin embargo, a pesar de la importancia que parece tener este gen en la modulación de los niveles de C-HDL, a la fecha no existen estudios adicionales que permitan confirmar su impacto en la regulación de los niveles de C-HDL y su posible relevancia desde edades tempranas.

El gen VNN1 y su proteína

El genoma humano codifica para tres genes de vanina (*Vascular Non-Inflammatory Molecule*) orientados en la misma dirección transcripcional (figura 2a), ocupando menos de 80kb y ubicados en el cromosoma 6q23-q24. Los genes *VNN* están conformados por igual en 7 exones y 6 intrones (figura 2b). *VNN1* codifica para un miembro de la familia de proteínas vanina (Martin y cols.,2001), las tres proteínas vanina poseen secuencias similares entre sí. Vanina 1 se expresa principalmente en bazo, timo, nódulos linfáticos, leucocitos de sangre periférica, uretra, riñón, hígado y tracto intestinal. Mientras que vanina 2 se encuentra mayormente expresado en bazo, riñón y neutrófilos y vanina 3 en hígado, leucocitos de sangre periférica y en algunas zonas del tracto respiratorio (Kaskow y cols., 2012).

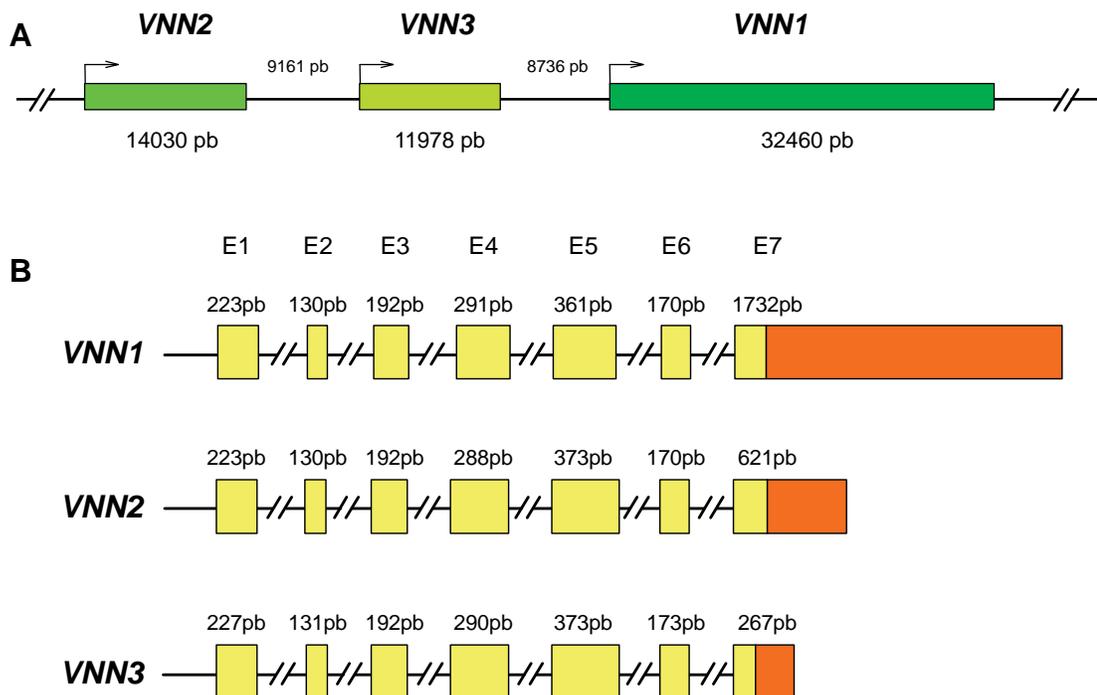


Figura 2A-B. Organización genómica de *VNN*. **A** Esquema del locus de los genes *VNN*. Los tres genes tienen la misma orientación transcripcional. **B** Diagrama ilustrativo de la organización de los 7 exones de *VNN* (Modificado de Martin y cols., 2001)

Vanina 1 tiene un peso molecular de 57KD y está constituido por 513 aminoácidos. Aunque no hay una clara evidencia de su papel en la regulación de los niveles de C-HDL, se sabe que esta proteína tiene actividad de panteteinasa, es decir, escinde la panteteína en ácido pantoténico (pantetonato o vitamina B5) y cisteamina, un antioxidante que previene la lipoperoxidación, jugando un papel importante en la respuesta ante el estrés oxidante (Kaskow y cols., 2012).

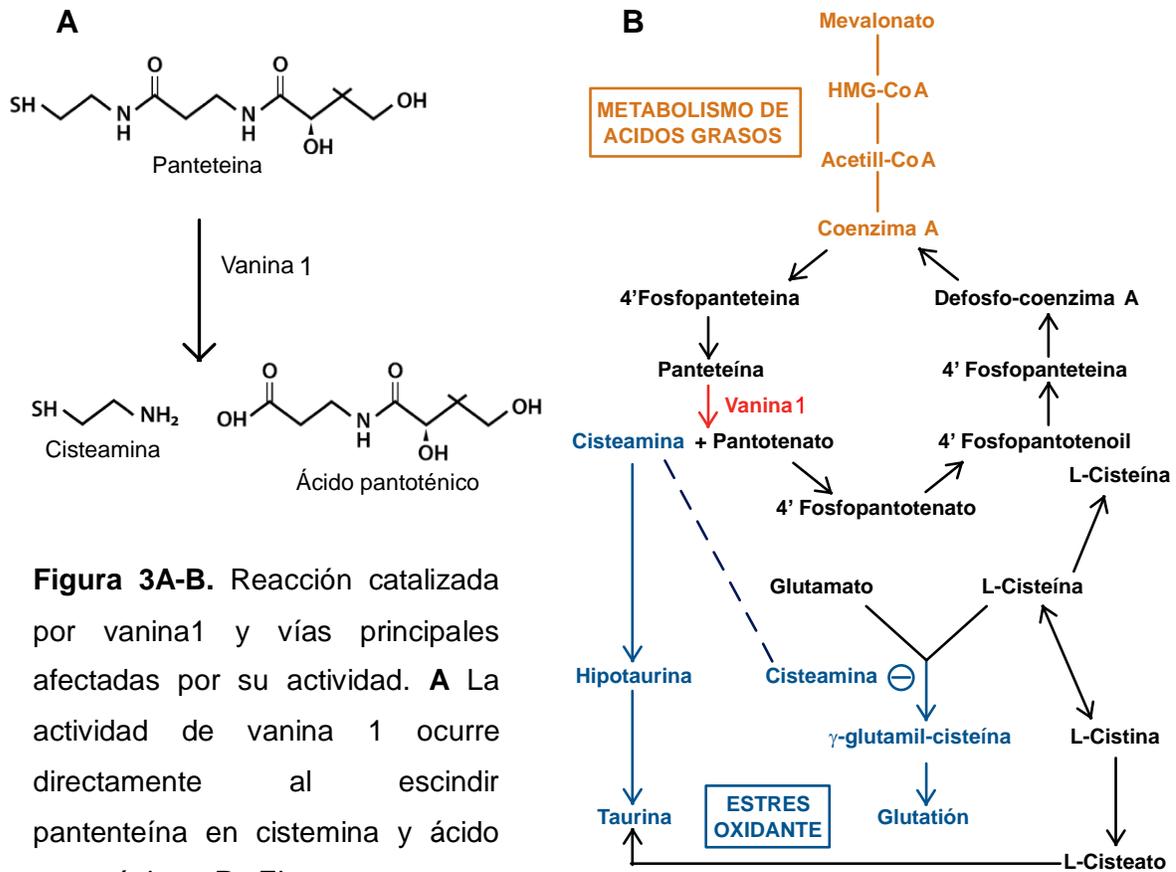


Figura 3A-B. Reacción catalizada por vanina1 y vías principales afectadas por su actividad. **A** La actividad de vanina 1 ocurre directamente al escindir panteteína en cisteamina y ácido pantoténico. **B** El pantotenato o ácido pantoténico, a través de varias transformaciones forma parte del metabolismo de ácidos grasos partiendo como Coenzima A, que tiene un papel importante en la biosíntesis y oxidación de ácidos grasos. Por otro lado la cisteamina, producto de la actividad de vanina 1, es transformada a cisteína, que junto con glutamato forman glutati3n, el principal antioxidante intracelular (Modificado de Kaskow y cols., 2012).

Planteamiento del problema

La hipoalfalipoproteinemia es la dislipidemia más prevalente en población mexicana y es un factor de riesgo para el desarrollo de enfermedad cardiovascular, causa número uno de muerte en el mundo. A pesar de que se sabe que los factores genéticos explican entre el 50 y 62% de la regulación de los niveles de C-HDL, poco se sabe de la regulación a través de la expresión génica. Determinar si el efecto de la expresión de *VNN1* es observable en población adolescente nos permitirá confirmar si el efecto reportado previamente en población adulta presenta algún impacto desde edades tempranas del desarrollo.

Objetivo

Evaluar la posible correlación entre la expresión del gen Vanina 1 (*VNN1*) y la variante G-137T (rs4897612) con los niveles plasmáticos de C-HDL y otros rasgos metabólicos en población adolescente mexicana.

Hipótesis

El gen *VNN1* y el polimorfismo G-137T están asociados a la regulación de los niveles de C-HDL en población adolescente.

Diseño experimental

Se realizó un estudio de tipo transversal con muestras de adolescentes que cumplieran mínimo con el valor de II en la escala de Tanner y/o que tenían al menos 12 años de edad. Consistió en la medición de parámetros bioquímicos y antropométricos, posteriormente se llevó a cabo la extracción de DNA para identificar la variante rs4897612 (G-137T) y la extracción de RNAm para medir

los niveles de expresión del gen *VNN1*. Con los datos obtenidos, finalmente se realizaron análisis estadísticos para correlacionar los niveles de RNAm y el polimorfismo rs4897612 con los parámetros bioquímicos de interés.

Materiales y métodos

Sujetos de estudio

Las muestras fueron obtenidas de la Convivencia Infantil de Verano 2010 para los hijos de los trabajadores de los Institutos de Salud. Se entregó una carta informativa a los padres (Apéndice I) y aquéllos que aceptaron que sus hijos participaran en el estudio, firmaron un consentimiento informado (Apéndice II).

Tabla 3. Parámetros establecidos para la escala de Tanner de desarrollo de caracteres sexuales

	<i>Vello púbico (ambos)</i>	<i>Genitales (hombres)</i>	<i>Busto (mujeres)</i>
Tanner I	Sin vello púbico [10 años y menores]	Prepúberes, volumen testicular menor de 1.5mL, pene de 3 cm o menor [normalmente de 9 años o menor]	No presentan tejido glandular, la areola sigue el contorno de la piel del pecho [normalmente de 10 años o menor]
Tanner II	Vello largo y fino con ligera pigmentación en la base del pene y escroto (hombres) o en los labios mayores (mujeres) [10 a 11.5 años]	Volumen testicular entre 1.6 y 6 mL, la piel del escroto se adelgaza, enrojece y cambia de tamaño. Longitud del pene sin cambios [9 a 11 años]	Área pequeña rodea el tejido glandular, areola empieza a ensancharse [10 a 11.5 años]
Tanner III	El vello se vuelve más grueso y rizado y comienza a extenderse lateralmente [11.5 a 13 años]	Volumen testicular entre 6 y 12 mL, el escroto se agranda más. El pene crece hasta cerca de 6 cm [11 a 12.5 años]	La mama se hace más elevada y se extiende más allá de los bordes de la areola, que continua ensanchándose pero sigue en el contorno mamario que la rodea [11.5 a 13 años]
Tanner IV	El vello es de tipo adulto y alcanza la sínfisis del pubis, pero sin llegar al muslo medial [15 años o más]	Volumen testicular entre 12 y 20 mL, el escroto se agranda más y oscurece. El pene aumenta de tamaño a 10 cm [12.5 a 14 años]	Hiperplasia e hipertrofia de la areola, la cual se pigmenta, aumenta rápidamente su diámetro y aparecen los corpúsculos de Morgagni. El volumen del busto inicia un crecimiento más acelerado. [13 a 15 años]

(Calzada-León y cols., 2001)

Se aplicó un cuestionario (Apéndices II, III, IV y V) y se tomaron muestras de sangre periférica de los niños cuyos padres firmaron el consentimiento. De éstos se seleccionaron individuos que cumplieran con los siguientes criterios:

-Ser individuos no relacionados, es decir, sin parentesco.

-Ser adolescentes, es decir, que cumplieran con el valor de II o más dentro de la escala de Tanner y/o al menos 12 años de edad para el caso de los niños que no contaran con su clasificación de Tanner (tabla 3).

Caracterización Bioquímica y Antropométrica

Las mediciones bioquímicas fueron realizadas en el Instituto Nacional de Ciencias Médicas y de la Nutrición “Salvador Zubirán” en un equipo automatizado (Boehringer-Mannheim). Se midieron parámetros bioquímicos como HDL-C, glucosa, triglicéridos, colesterol total, LDL-C y se calcularon los índices aterogénicos.

La hipoalfalipoproteinemia se definió como niveles de C-HDL menores de 35 mg/dL (*Expert Panel on Integrated Guidelines for Cardiovascular Health and Risk Reduction in Children and Adolescents*, 2011), mientras que la hipertrigliceridemia fue definida como niveles de triglicéridos mayores de 150 mg/dL (Zimmet y cols., 2007)

A su vez se midieron características antropométricas como peso, talla, cintura, cadera, porcentaje de grasa corporal, presión arterial y se calculó el índice de masa corporal de cada individuo mediante la fórmula:

$$\text{IMC} = \frac{\text{peso (kg)}}{\text{altura}^2 \text{ (m}^2\text{)}}$$

La obesidad se definió de acuerdo al Centro de Control y Prevención de Enfermedades como individuos con una percentila del IMC igual o mayor a la percentila 95 (CDC, 2011)

Extracción de DNA

Se realizó a partir de leucocitos provenientes de sangre total con el kit QIAmp 96 DNA (Applied Biosystems) de acuerdo a las especificaciones del fabricante. Se realizaron diluciones de 10ng/mL para su uso posterior. A continuación se describe en breve la técnica de extracción:

1. A cada uno de los 96 pozos de la placa añadir: 200 μ L de sangre, 20 μ L de proteasa y 200 μ L de solución amortiguadora AL. Colocar tapas y mezclar vigorosamente. Bajar con un pulso de centrifuga.
2. Incubar a 70 °C durante 15 a 30 minutos.
3. Agregar 200 μ L de etanol absoluto, mezclar.
4. Pasar el volumen total a la placa con columnas y posicionarla sobre la caja recolectora.
5. Cubrir pegando mica adherible.
6. Centrifugar a 3700 rpm por 12 minutos.
7. Adicionar solución amortiguadora AW1, 500 μ L y centrifugar a 3700 rpm durante 8 minutos.
8. Adicionar solución amortiguadora AW2, 500 μ L y centrifugar a 3700 rpm durante 15 minutos.
9. Agregar solución amortiguadora de elución AE o agua MilliQ 200 μ L y colocar sobre la placa colectora.
10. Centrifugar a 3700 rpm por 4 minutos.

Genotipificación de la variante G-137T

El polimorfismo rs4897612 (G-137T) del gen *VNN1* se genotipificó utilizando sondas TaqMan por PCR en tiempo real (LightCycler 480 II, Roche). Para verificar la confiabilidad del ensayo, se colocó un control positivo para cada

genotipo, que consistieron en muestras secuenciadas para asegurar su genotipo y un control negativo. La mezcla de reacción consistió en:

	1 Rx (μ L)
Master Mix	2.5
Sonda	0.15
Agua	0.35
DNA	2

Y se llevó a cabo de acuerdo a las siguientes condiciones de reacción:

<i>Periodo</i>	<i>Ciclos</i>	<i>Temp (°C)</i>	<i>Tiempo</i>
Preincubación	1	95	10 min
Amplificación	40	95	10 seg
		60	1 min
		72	1 seg
Enfriamiento	1	40	30 seg

Extracción de RNA de leucocitos a partir de sangre periférica

La extracción de RNA se efectuó por el método de isotiocianato de guanidina y fenol-cloroformo a partir de muestras de sangre periférica de acuerdo con el siguiente procedimiento:

1. Centrifugar las muestras de sangre (3 ml) 20 min a 2200 rpm a temperatura ambiente.
2. De las dos fases obtenidas, tomar la capa de leucocitos, localizada entre el plasma y glóbulos rojos, y colocarlos en un microtubo de 1.5 ml . Adicionar 750 μ L de TRIzol.
3. Homogenizar utilizando un vórtex durante 60 segundos; enseguida adicionar 150 μ l de cloroformo y homogenizar nuevamente 15 segundos con vórtex.

4. Centrifugar a 14000 rpm durante 15 min a 4°C.
5. Se observan cuatro fases de abajo hacia arriba en el siguiente orden: cloroformo, proteínas y eritrocitos lisados, capa delgada de DNA, fase transparente que tiene RNA disuelto. Separar la fase que contiene RNA y transferirla a un microtubo nuevo cuidando no tomar DNA.
6. Adicionar 375 μ L de isopropanol y mezclar por inversión. Incubar en hielo 30 min.
7. Centrifugar a 14000 rpm durante 10 min a 4°C. Desechar el sobrenadante y resuspender el botón de RNA con 750 μ L de etanol al 75% para lavarlo.
8. Centrifugar a 14000 rpm durante 2 min a 4°C. Eliminar el etanol y repetir el lavado.
9. Después de centrifugar por segunda vez, eliminar el etanol y secar el botón 10 min a temperatura ambiente.
10. Resuspender el botón en 25 μ L de agua MilliQ.
11. Para eliminar el DNA residual se realiza un tratamiento con DNasa e inhibidores de RNasa.

Tratamiento con DNasa

El tratamiento para eliminar el DNA residual se realizó con las siguientes cantidades de reactivos:

	1 Rx (μ L)
Solución amortiguadora de incubación	5
DNasa	1
Inhibidor	1
Agua	5
RNA	cbp 10 μ g

Cuantificación espectrofotométrica del RNA y DNA

Se cuantificó el RNA y el DNA de cada muestra utilizando un equipo NanoDrop Spectrophotometer ND-1000 para conocer la concentración obtenida y verificar la calidad del DNA y RNA mediante la relación de absorbancia 260/280

Electroforesis en gel de Agarosa

Se preparó un gel de agarosa al 1% de la siguiente forma: pesar 0.3 g de agarosa y colocarla en 30mL de solución amortiguadora TAE 1X. La corrida se realizó durante 20 min a 65 mV para el RNA y 15 minutos a 70 mV para DNA. El gel de agarosa permitió verificar la integridad del DNA observándose una banda definida, mientras que para verificar la integridad del RNA extraído se observaron las bandas correspondientes a los ribosomas 28s y 18s.

Síntesis de cDNA

Para realizar la síntesis de cDNA se utilizó el kit TaqMan *Reverse Transcription Reagents* (Applied Biosystems manufactured by Roche Molecular Systems, Branchburg, New Jersey USA) y se preparó la siguiente mezcla de reacción:

	1Rx (μL)
Solución amortiguadora Taqman 10X	5
MgCl ₂	11
dNTPs	10
Hexámeros	2.5
Inhibidor de RNasa	1
Transcriptasa reversa	1.25
Volumen de RNA para 1 μg + agua	19.25
<hr/>	
TOTAL	50

La reacción se llevó a cabo en un termociclador (GeneAmp 9700, Applied Biosystems) de acuerdo con las siguientes condiciones de reacción:

Condiciones de reacción	
25 °C	10 min
48 °C	30 min
95 °C	5 min

Ensayos de expresión con PCR en tiempo real

El ensayo de expresión se realizó mediante PCR en tiempo real (Light Cycler, Roche), preparando dos mezclas de reacción, una para el gen de interés (*VNN1*) y otra para el gen constitutivo, que en este caso se utilizó *β-actina* (Universal ProbeLibrary Human *ACTB* Gene Assay, Roche Diagnosis, Indianapolis, USA). Para evaluar la reproducibilidad de los ensayos se utilizaron controles inter-ensayos; así como un control negativo.

Condiciones de reacción:

<i>VNN1</i>	1 Rx (μL)	<i>β-actina</i>	1 Rx (μL)
LightCycler Master Mix	2.0	LightCycler Master Mix	2.0
Oligonucleótido iniciador R	0.2	Oligonucleótido iniciador <i>β-actina</i>	0.1
Oligonucleótido iniciador L	0.2	Sonda Bact	0.1
Sonda 80	0.1	cDNA	1.0
cDNA	1.0	H2O	6.8
H2O	6.5		

Análisis estadístico

El análisis estadístico se realizó utilizando el programa SPSS 15.0 para Windows. Se utilizó prueba de T para evaluar diferencias significativas de los parámetros metabólicos de acuerdo a género. Para evaluar la correlación entre los niveles de expresión de *VNN1* y los parámetros metabólicos estudiados se realizaron correlaciones bivariadas no paramétricas de Spearman. El efecto de la variante G-137T sobre los parámetros metabólicos de interés se evaluó utilizando regresión lineal. Valores de $p \leq 0.05$ fueron considerados significativos.

Resultados

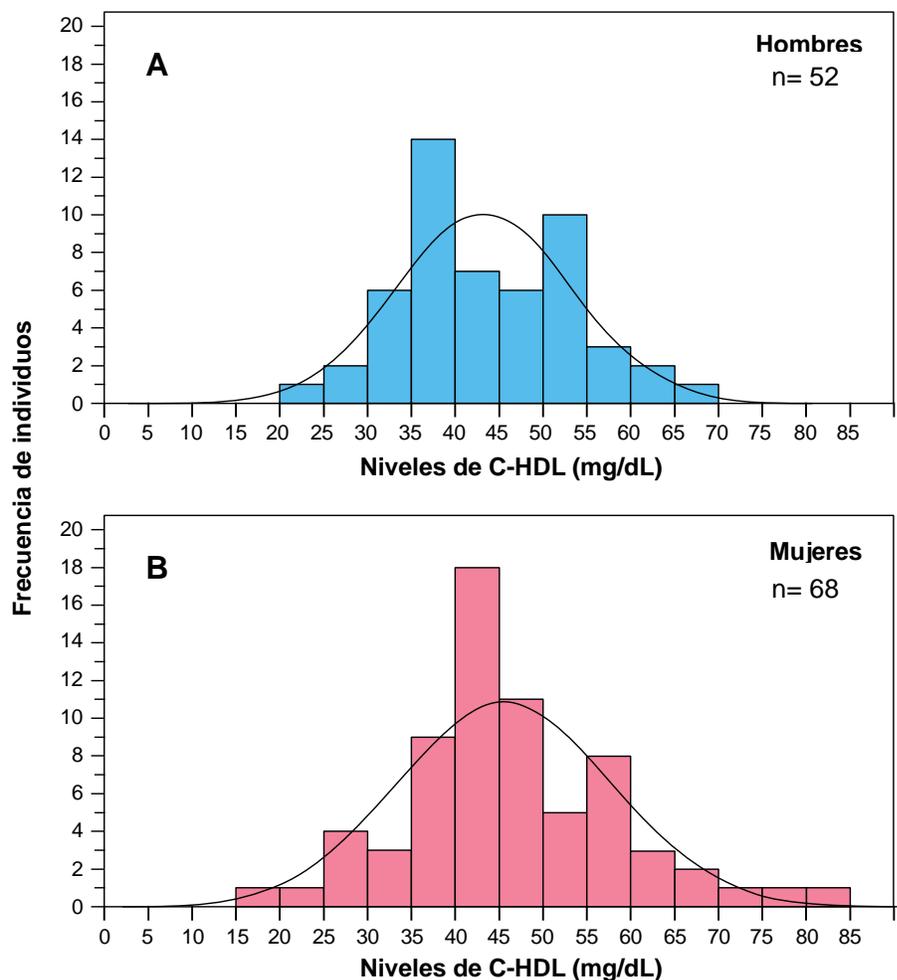
Durante la Convivencia Infantil de Verano 2010 de la Secretaría de Salud se tomaron muestras de sangre periférica de 1049 niños, de los cuales 120 adolescentes fueron seleccionados con base en la escala de Tanner (presentando al menos nivel II). Las variables antropométricas y bioquímicas estudiadas en la población total (120 adolescentes), así como por estratificación por género se muestran en la Tabla 4. El z-score del IMC, el peso corporal y los niveles de glucosa fueron significativamente más altos en el grupo de los niños que en las niñas ($P=0.002$, 0.005 y 0.0002 , respectivamente).

Tabla 4. *Parámetros bioquímicos y antropométricos de acuerdo al género*

Parámetros	Total (120)	Niños(52)	Niñas(68)	P
Edad (años)	12.05±0.75	12.14±0.65	11.99±0.81	0.200
Z-score IMC	0.83±1.07	1.13±0.60	0.93±1.11	0.002
Peso (kg)	50.64±12.72	53.97±13.06	48.17±11.95	0.005
Glucosa (mg/dL)	89.40±8.17	92.17±7.41	87.33±8.13	0.0002
C-HDL (mg/dL)	44.49±11.04	43.45±9.42	45.27±12.10	0.313
ApoA1 (mg/dL)	162.17±29.53	163.89±28.75	160.99±4.86	0.695
TG (mg/dL)	122.94±66.22	121.60±66.79	123.93±66.15	0.830
CT (mg/dL)	162.03±30.89	162.91±34.32	161.38±28.23	0.761
C-LDL (mg/dL)	92.94±23.52	95.12±24.42	91.30±22.83	0.321
Frecuencias n (%)				
Obesidad	32 (26.3)	21 (40.9)	11 (15.9)	0.020
TG≥150 (mg/dL)	30 (25.3)	12 (24.2)	18 (26.1)	0.804
HDL<40 (mg/dL)	41 (34.2)	23 (44.2)	18 (26.5)	0.217

Los datos muestran medias ± DE. IMC, índice de masa corporal; CT, colesterol total; TG, triglicéridos; C-HDL, lipoproteínas de alta densidad. Valor de P para los parámetros obtenido mediante prueba de T y para las frecuencias mediante χ^2 .

La media de los niveles de C-HDL fue menor en los niños que en la niñas, sin diferencias significativas (Tabla 4). Las gráficas 1A y 1B muestran la frecuencia de distribución de los niveles de C-HDL estratificadas por género. El 44.2% de los niños y el 26.5% de las niñas presentan niveles de C-HDL menores a 40mg/dL, de los cuales 26.9% y 13.2% respectivamente tienen niveles entre 35 y 40mg/dL.



Gráfica 1A-B. Distribución de los niveles de C-HDL en los adolescentes estudiados estratificando por género.

Debido a que la concentración y calidad del RNA obtenido de 39 de las 120 muestras seleccionadas no fue la requerida para los análisis de expresión del gen *VNN1*, se incluyeron solamente 81 muestras (37 niños y 44 niñas). Los resultados del análisis de correlación entre los niveles de expresión del gen *VNN1* y las variables metabólicas estudiadas se presentan en la Tabla 5. No se observó correlación significativa entre los niveles de C-HDL y la expresión de *VNN1*, tanto en la muestra total como estratificada por género (Tabla 6). Sin embargo, en el grupo de las niñas se encontró una correlación positiva y significativa de los niveles de expresión de *VNN1* con el z-score del IMC (P=0.049, Tabla 6).

Tabla 5. Análisis de correlación entre los niveles de expresión de *VNN1* y los parámetros metabólicos estudiados

Niveles de RNAm de <i>VNN1</i>			
Parámetros metabólicos	n	r	P
IMC z-score	80	0.091	0.421
Peso (kg)	80	0.041	0.716
Glucosa (mg/dL)	81	-0.128	0.255
C-HDL (mg/dL)	81	0.044	0.696
ApoA1 (mg/dL)	66	-0.088	0.482
Triglicéridos (mg/dL)	81	-0.083	0.462
Colesterol total (mg/dL)	81	-0.074	0.513
C-LDL (mg/dL)	76	-0.070	0.549

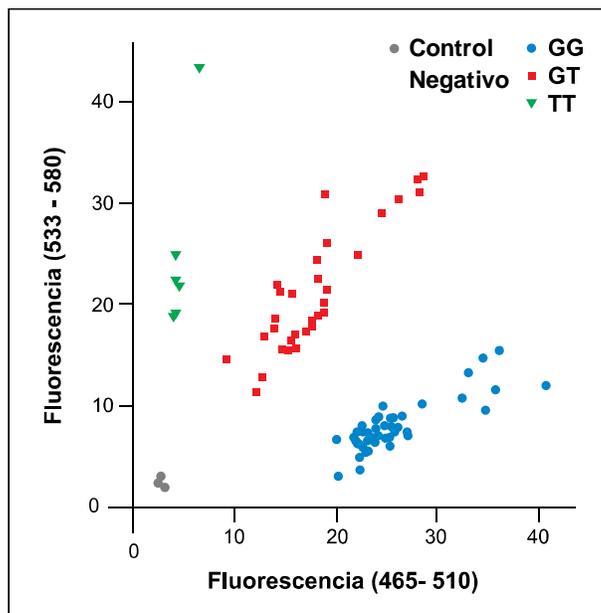
IMC, Índice de masa corporal ; C-HDL, Colesterol HDL; C-LDL, Colesterol LDL

Tabla 6. Análisis de correlación entre los niveles de expresión de VNN1 y los parámetros metabólicos estudiados por género

Niveles de RNAm de VNN1						
Parámetros	Niños			Niñas		
	n	r	P	n	r	P
z-score IMC	36	0.022	0.900	44	0.298	0.049
Peso (kg)	36	-0.033	0.848	44	0.220	0.151
Glucosa (mg/dL)	37	-0.209	0.215	44	0.085	0.845
C-HDL (mg/dL)	37	-0.091	0.593	44	0.093	0.559
ApoA1 (mg/dL)	27	-0.069	0.734	39	-0.038	0.819
Triglicéridos (mg/dL)	37	-0.195	0.246	44	0.000	1.000
CT (mg/dL)	37	-0.287	0.085	44	0.173	0.262
C-LDL (mg/dL)	34	-0.170	0.335	42	0.073	0.647

IMC, Índice de masa corporal ; C-HDL, Colesterol HDL ; C-LDL, Colesterol LDL

Variante G-137T y su asociación con los niveles de expresión de VNN1



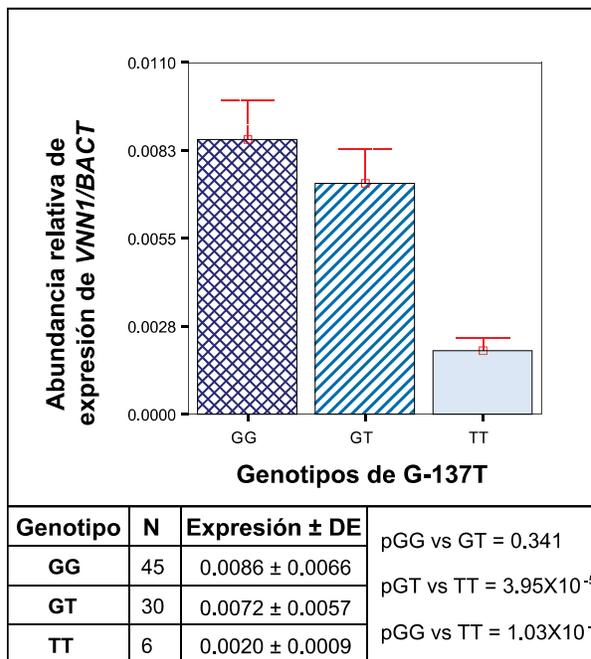
Gráfica 2. Genotipificación de la variante G-137T (n=81)

El análisis de discriminación alélica para la genotipificación de la variante G-137T permitió identificar 45 individuos homocigotos GG (56%), 30 heterocigotos GT (37%) y 6 homocigotos TT (7%): La frecuencia del alelo T fue del 25.9% y tanto la muestra total como estratificada siguieron el equilibrio de Hardy-Weinberg (P>0.05). En todos los ensayos de genotipificación se incluyeron

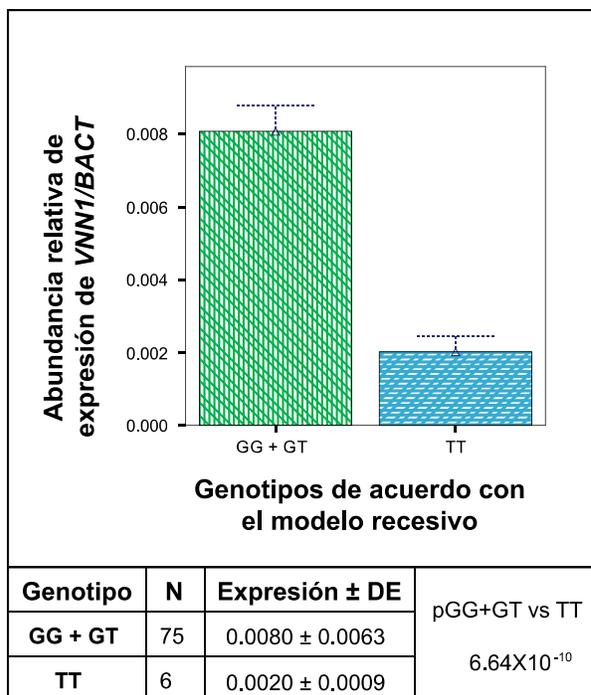
controles positivos previamente secuenciados para los distintos genotipos y negativos de amplificación, los cuales resultaron de acuerdo a lo esperado.

De manera interesante, se observó que los adolescentes portadores del genotipo TT presentan niveles de expresión de *VNN1* significativamente menores que los portadores tanto de los genotipos GT como GG ($P=3.9 \times 10^{-5}$ y 1.03×10^{-7} , respectivamente), sugiriendo que este efecto es dependiente de la dosis alélica (Gráfica 3).

Debido a que no se observaron diferencias significativas entre los niveles de expresión de *VNN1* al comparar los genotipos GG vs. GT, se propuso un modelo recesivo (GG+GT vs. TT), como el más adecuado para evaluar el efecto de la variante G-137T sobre distintos parámetros metabólicos (Gráfica 4).



Gráfica 3. Asociación de los niveles de expresión de *VNN1* en los genotipos de la variante G-137T



Gráfica 4. Asociación de los niveles de expresión de *VNN1* con la variante G-137T bajo el modelo recesivo

Tabla 7. Asociación de la variante G-137T en un modelo recesivo con parámetros metabólicos de interés

Parámetros	Efecto (EE)	P	P ^a
z-score IMC	-0.071 (0.473)	0.880	-----
Peso (kg)	4.315 (5.229)	0.412	-----
Glucosa (mg/dL)	0.493 (3.572)	0.891	0.860
C-HDL (mg/dL)	-6.347 (5.005)	0.209	0.158
ApoA1 (mg/dL)	-0.192 (12.744)	0.988	0.963
TG (mg/dL)	32.593 (28.441)	0.255	0.205
CT (mg/dL)	2.240 (14.458)	0.877	0.951
C-LDL (mg/dL)	-4.625 (11.445)	0.687	0.900

Los valores de efecto se presentan como efecto por la presencia de TT y error estándar (EE). ^a Ajustado por z-score del IMC. nGG+GT=75, nTT=6

En la Tabla 7 se muestran los resultados de la asociación de la variante G-137T con los distintos parámetros metabólicos estudiados. Se observó que el genotipo TT disminuye 6.3 mg/dL los niveles de C-HDL; sin embargo, este resultado no fue significativo ($P=0.158$). Al estratificar por género, el genotipo TT se asoció de manera significativa con un menor z-score del IMC solamente en las niñas ($P=0.013$, Tabla 8).

Tabla 8. Asociación de la variante G-137T en un modelo recesivo con parámetros metabólicos de interés de acuerdo a género

Parámetros	Niños (37)			Niñas (44)		
	Efecto (EE)	P	P ^a	Efecto (EE)	P	P ^a
z-score IMC	0.718 (0.518)	0.175	-----	-1.985 (0.764)	0.013	-----
Peso (kg)	11.656 (6.501)	0.082	-----	-13.143 (8.164)	0.115	-----
Glucosa (mg/dL)	0.644 (4.123)	0.877	0.958	-3.976 (5.726)	0.491	0.757
C-HDL (mg/dL)	-4.894 (5.608)	0.389	0.753	-7.286 (9.286)	0.437	0.115
ApoA1 (mg/dL)	2.185 (15.878)	0.892	0.631	-6.838 (22.231)	0.761	0.291
TG (mg/dL)	37.045 (40.128)	0.362	0.678	13.714 (42.969)	0.751	0.798
CT (mg/dL)	2.894 (21.918)	0.896	0.919	-2.524 (19.705)	0.899	0.635
C-LDL (mg/dL)	-10.495 (17.763)	0.559	0.724	2.050 (14.990)	0.892	0.609

Los valores de efecto se presentan como efecto por la presencia de TT y error estándar (EE). ^a Ajustado por z-score del IMC. Niños nGG+GT=33 , nTT=4 ; niñas nGG+GT=42 , nTT=2

Discusión y conclusiones

Epidemiología

Diversos estudios epidemiológicos han mostrado una alta prevalencia de enfermedades metabólicas asociadas a la obesidad desde la infancia (Saland, 2007, Nathan, 2008). En este estudio en adolescentes se encontró una frecuencia del 26.3% de obesidad, la cual fue significativamente más alta en niños que en niñas (40.9 vs. 15.9%, respectivamente). De manera interesante, la frecuencia de obesidad observada en este estudio fue mayor a la reportada por la ENSANUT 2006 para este grupo etario, pero similar a la observada en otros trabajos de población infantil de la Ciudad de México (Posadas-Sánchez, 2007).,

Una de las complicaciones metabólicas más comunes de la obesidad es la alteración del perfil lipídico, siendo de particular interés para este estudio la variación de las lipoproteínas de alta densidad (HDL). La frecuencia de sujetos con niveles bajos de HDL (<40 mg/dL) fue del 34% en la población de estudio, siendo más frecuente en los niños que en las niñas (44.2 vs. 26.5%, respectivamente). Para comparar estos resultados con el único estudio previo en adolescentes mexicanos, también se utilizó el corte de <35 mg/dL (como definición de niveles bajos de C-HDL), encontrando una frecuencia de 14.9%, un valor similar al 15.1% observado por Posadas-Sanchez y col. 2007 en una muestra de adolescentes de la Ciudad de México. La prevalencia de niveles bajos de C-HDL obtenida es más alta que la que se presenta en otras poblaciones adolescentes, incluyendo poblaciones de origen europeo y africano (Dumitrescu, 2011).

Expresión de VNN1 y niveles de C-HDL

En el presente trabajo se analizaron los niveles de expresión del gen *VNN1* y su relación con parámetros metabólicos, en particular con los niveles de C-HDL. Sin embargo, a diferencia de lo reportado en población adulta mexicano-

americana, donde la expresión de *VNN1* correlacionó con los niveles de C-HDL (Göring, 2007), en este estudio no se observó correlación entre los niveles de expresión de *VNN1* y los niveles séricos de C-HDL. La falta de réplica se puede deber al tamaño reducido de la muestra estudiada y/o probablemente puede ser causada por la diferencia cronológica en la maduración sexual; los cambios hormonales en la adolescencia pueden enmascarar la posible correlación entre los niveles de expresión y el C-HDL en la muestra estudiada (Landázuri y cols., 2009). Sin embargo, es de llamar la atención que en una muestra de población infantil, analizada previamente por nuestro grupo de investigación, se replicó la correlación positiva observada en adultos entre los niveles de expresión de *VNN1* y los niveles séricos de C-HDL (Jacobo-Albavera y cols., 2012).

Por otra parte, los niveles de expresión de *VNN1* correlacionaron de manera positiva y significativa con el z-score del IMC únicamente en las niñas adolescentes. Interesantemente, en población infantil también se encontró una correlación del z-score del IMC con los niveles de expresión de *VNN1* y al igual que en población adolescente, esto se presenta únicamente para el género femenino, aunque la correlación establecida fue en sentido contrario a la observada en los adolescentes (Jacobo-Albavera y cols., 2012). En el trabajo realizado en adultos mexico-americanos sólo se muestran resultados con los niveles de C-HDL (Göring y cols., 2007), por lo que no fue posible comparar nuestros resultados de otras variables bioquímicas o antropométricas.

Polimorfismo G-137T y expresión de VNN1

Los adolescentes portadores del genotipo TT de la variante G-137T mostraron niveles más bajos de expresión de *VNN1* que los otros genotipos, lo cual es congruente con lo observado en población adulta Mexico-Americana y población infantil (Göring y cols., 2007, Jacobo-Albavera y cols., 2012), esto sugiere que el efecto de la variante sobre los niveles de expresión se mantiene a lo largo del desarrollo.

Los resultados de este estudio confirman la importancia de la variante G-137T en la regulación de la expresión de *VNN1*. Este cambio de base se localiza en un sitio de unión, elemento de respuesta, para el factor de transcripción Sp1 (*Stimulating protein 1*) que reconoce secuencias ricas en G (Göring y cols., 2007). Esto nos habla de una regulación en *cis* de la expresión del gen, a través de un cambio en la secuencia en la región promotora del gen que modifica la transcripción (Figura 4).

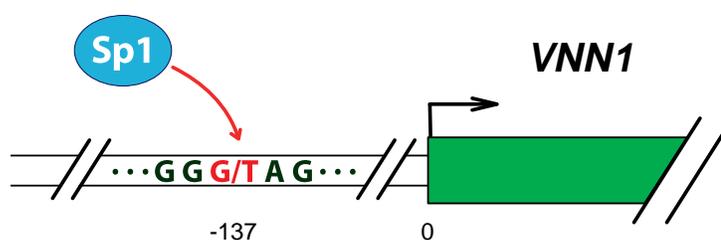


Figura 4. La variante G-137T se localiza en el promotor de *VNN1* dentro de un elemento de respuesta para Sp1, un factor de transcripción que reconoce secuencias ricas en G.

Polimorfismo-fenotipo

La presencia de la variante no se asoció de manera significativa con los niveles de C-HDL en los adolescentes. Sin embargo, en niñas de 6 a 8 años se ha reportado que el genotipo TT se asocia a niveles menores de C-HDL (Jacobo-Albavera y cols., 2012). Los niveles de C-HDL se modifican a lo largo del desarrollo; durante la infancia los niños presentan niveles más elevados de C-HDL que las niñas. Este comportamiento se modifica a partir de la adolescencia debido principalmente a cambios hormonales entre los 10 y 11 años, a la maduración gonadal y a la producción de hormonas sexuales a partir del colesterol, disminuyendo los niveles de C-HDL en los varones (Landázuri y cols., 2009).

A pesar de no haber observado asociación con los niveles de C-HDL en la muestra total o estratificada por género, es de llamar la atención que las niñas portadoras del genotipo TT mostraron asociación con valores menores de z-score del IMC. Este parámetro es utilizado en vez del IMC principalmente en poblaciones de edades tempranas que aún se encuentran en etapa de desarrollo, ya que considera la edad y el género. Sin embargo este resultado debe tomarse con cautela, considerando que debido a la baja frecuencia del alelo T sólo se cuenta con dos portadoras del genotipo TT; para confirmar este hallazgo, es necesario incrementar el tamaño de la muestra en estudio.

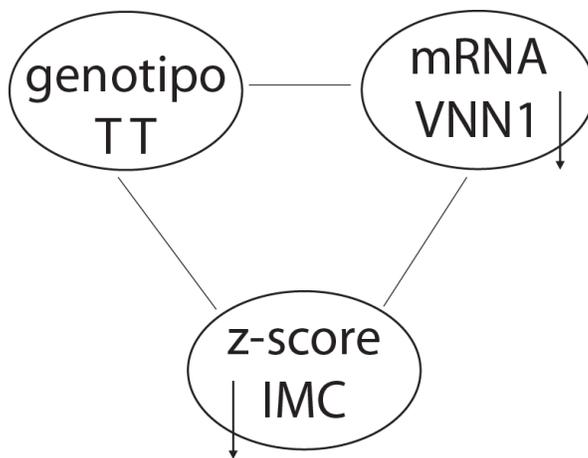


Figura 5. Las portadoras del genotipo TT del polimorfismo G-137T presentan los niveles más bajos de expresión. Al mismo tiempo el genotipo TT tiene un efecto de disminución sobre el z-score del IMC, lo cual es congruente con la correlación positiva entre los niveles de expresión de *VNN1* y el z-score del IMC.

Es claro que en este estudio, el género es un factor importante a considerar, ya que la distribución y utilización de lípidos son diferentes de acuerdo éste (Sugiyama y cols., 2012). Este tipo de asociaciones específicas por género, han sido previamente observadas para otros genes, por ejemplo el gen *ABCA8*, que se asocia a algunos parámetros del perfil lipídico sólo en mujeres (Teslovich y cols., 2010). Además, para otros genes como el de la prolactina y el receptor de leptina, se ha reportado asociación con el IMC solamente en hombres o mujeres, respectivamente (Nilsson y cols., 2011; Riestra y cols., 2010).

Los resultados obtenidos sugieren que *VNN1* tiene un efecto sobre el IMC, por lo que es probable que este gen participe en los procesos de regulación de acumulación de grasa. A este respecto, en un estudio de expresión génica

global en un modelo de ratón se encontraron evidencias que sugieren que *VNN1* podría ser considerado como un gen candidato para la obesidad (Schadt y cols., 2005).

Tabla 9. Comparación de los resultados obtenidos en diferentes trabajos de *VNN1* con relación a los niveles de expresión, C-HDL y el IMC.

		Niños (Jacobo-Albavera y cols., 2012)	Adolescentes (Presente estudio)	Adultos (Göring y cols., 2007)
Variante G-137T	Expresión	Genotipo TT presenta menor expresión	Genotipo TT presenta menor expresión	El genotipo regula la expresión de <i>VNN1</i>
	HDL	Genotipo TT disminuye HDL en niñas	Genotipo TT tendencia a niveles menores en las niñas	No se especifica
	IMC	Genotipo TT aumenta el IMC	Genotipo TT disminuye IMC	No reportado

En conclusión, la expresión del gen *VNN1* y la variante G-137T modulan el IMC en las adolescentes; esto es congruente con la asociación específica por género reportada en población infantil (Tabla 9), por ello se requiere ampliar la muestra para confirmar estos hallazgos y verificar que en los adolescentes, el gen *VNN1* no presenta efectos sobre los niveles de C-HDL.

Referencias

Aguilar-Salinas CA, Olaiz G, Valles V, Torres JM, Gómez Pérez FJ, Rull JA y cols. High prevalence of low HDL cholesterol concentrations and mixed hyperlipidemia in a Mexican nationwide survey. *J Lipid Res.* 2001;42(8):1298-307.

Bauduceau B, Vachey E, Mayaudon H, Burnat P, Dupuy O, Garcia C y cols. Should we have more definitions of metabolic syndrome or simply take waist measurement? *Diabetes Metab.* 2007;33(5):333-9.

Barter P. HDL-C: Role as a risk modifier. *Atheroscler Suppl.* 2011; 12(3):267-70.

Brumfield RT, Beerli P, Nickerson DA, Edwards SV. The utility of single nucleotide polymorphisms in inferences of population history. *Trends in Ecology & Evolution.* 2003;18(5): 249-256.

Calzada-León R, Ruiz-Reyes ML, Altamirano-Bustamante N. Características sexuales secundarias. *Acta Pediatr Méx.* 2001;22(2): 122-127

Center for Disease Control and Prevention [Actualizado Septiembre 2011; citado Abril 2012]. Disponible en <http://www.cdc.gov/healthyweight/assessing/bmi/>

Dumitrescu L, Brown-Gentry K, Goodloe R, Glenn K, Yang W, Kornegay N y cols. Evidence for age as a modifier of genetic associations for lipid levels. *Ann Hum Genet.* 2011;75(5):589-97.

Expert Panel on Integrated Guidelines for Cardiovascular Health and Risk Reduction in Children and Adolescents. Expert panel on integrated guidelines for cardiovascular health and risk reduction in children and adolescents: summary report. *Pediatrics* 2011;128 Suppl 5:S213-56

Goode EL, Cherny SS, Christian JC, Jarvik GP, de Andrade M. Heritability of longitudinal measures of body mass index and lipid and lipoprotein levels in aging twins. *Twin Res Hum Genet.* 2007;10(5):703-11.

Göring HH, Curran JE, Johnson MP, Dyer TD, Blangero J. Discovery of expression QTLs using large-scale transcriptional profiling in human lymphocytes. *Nat Genet* 2007;39(10):1208-16.

Grundy SM, Pasternak R, Greenland P, Smith S Jr, Fuster V. Assessment of cardiovascular risk by use of multiple-risk-factor assessment equations: a statement for healthcare professionals from the American Heart Association and the American College of Cardiology. *Circulation* 1999;100(13):1481-92.

Halonen JI, Zanobetti A, Sparrow D, Vokonas PS, Schwartz J. Outdoor temperature is associated with serum HDL and LDL. *Environ Res.* 2011;111(2):281-7.

Kaskow BJ, Michael Proffit J, Blangero J, Moses EK, Abraham LJ. Diverse biological activities of the vascular non-inflammatory molecules - The Vanin pantetheinases. *Biochem Biophys Res Commun.* 2012;417(2):653-8.

Landázuri P, Loango N, Gallego ML, Restrepo B. Gender, age and plasma lipids differences associated with apolipoprotein E polymorphism in school children. *Biomedica.* 2009;29(3):382-91.

Lindbohm N. Sialic Acid in Lipoproteins with a Special Reference to Low Density Lipoproteins. University of Helsinki, Institute of Clinical Medicine, Faculty of Medicine. 2000.

Martin F, Malergue F, Pitari G, Philippe JM, Philips S, Chabret C y cols. Vanin genes are clustered (human 6q22-24 and mouse 10A2B1) and encode isoforms of pantetheinase ectoenzymes. *Immunogenetics.* 2001;53(4):296-306.

McPherson R, "Cholesteryl ester transfer protein (CETP)," in AccessScience, ©McGraw-Hill Companies, 2007, <http://www.accessscience.com>

Medina-Urrutia A, Juarez-Rojas JG, Martínez-Alvarado R, Jorge-Galarza E, Posadas-Sánchez R, Cardoso-Saldaña G y cols. High-density lipoprotein subclasses distribution and composition in Mexican adolescents with low HDL

cholesterol and/or high triglyceride concentrations, and its association with insulin and C-reactive protein. *Atherosclerosis*. 2008;201(2):392-7.

Nilsson L, Olsson AH, Isomaa B, Groop L, Billig H, Ling C. A common variant near the PRL gene is associated with increased adiposity in males. *Mol Genet Metab*. 2011;102(1):78-81.

Organización Mundial de la Salud. Enfermedades cardiovasculares. septiembre 2011, <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs317/es/index.html>

Posadas-Sánchez R, Posadas-Romero C, Zamora-González J, Mendoza-Pérez E, Cardoso-Saldaña G, Yamamoto-Kimura L. Lipid and lipoprotein profiles and prevalence of dyslipidemia in Mexican adolescents. *Metabolism*. 2007;56(12):1666-72.

Pil-Byung C, Shin-Hwan Y, Il-Gyu K, Gwang-Suk H, Jae-Hyun Y, Han-Joon L y cols. Effects of exercise program on appetite-regulating hormones, inflammatory mediators, lipid profiles, and body composition in healthy men. *J Sports Med Phys Fitness*. 2011;51(4):654-63.

Rader DJ. Molecular regulation of HDL metabolism and function: implication for novel therapies. *J Clin Invest*. 2006;116(12):3090-100.

Riestra P, García-Anguita A, Schoppen S, López-Simón L, De Oya M, Garcés C. Sex-specific association between leptin receptor polymorphisms and leptin levels and BMI in healthy adolescents. *Acta Paediatr*. 2010;99(10):1527-30.

Schadt EE, Lamb J, Yang X, Zhu J, Edwards S, Guhathakurta D y cols. An integrative genomics approach to infer causal associations between gene expression and disease. *Nat Genet*. 2005;37(7):710-7.

Sheikholeslami Vatani D, Ahmadi S, Ahmadi Dehrashid K, Gharibi F. Changes in cardiovascular risk factors and inflammatory markers of young, healthy, men after six weeks of moderate or high intensity resistance training. *J Sports Med Phys Fitness*. 2011;51(4):695-700.

SNP Fact Sheet. Department of Energy Genome Program's Biological and Environmental Research Information System, US. [Actualizado Septiembre 2008, citado Marzo 2012]. Disponible en <http://genomics.energy.gov>

Sugiyama MG, Agellon LB. Sex differences in lipid metabolism and metabolic disease risk. *Biochem Cell Biol.* 2012;90(2):124-41.

Tall AR. Plasma high density lipoproteins. Metabolism and relationship to atherogenesis. *J Clin Invest.* 1990;86(2):379-84. Review

Taskinen MR. Diabetic dyslipidaemia: from basic research to clinical practice. *Diabetologia* 2003;46(6):733-49.

Teslovich TM, Musunuru K, Smith AV, Edmondson AC, Stylianou IM, Koseki M y cols. Biological, clinical and population relevance of 95 loci for blood lipids. *Nature.* 2010;466(7307):707-13.

Tudela V. El colesterol: lo bueno y lo malo. 4ta ed. FCE, SEP, CONACyT, México, 2008.

Von Eckardstein A, Nofer JR, Assmann G. High density lipoproteins and arteriosclerosis. Role of cholesterol efflux and reverse cholesterol transport. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2001;21(1):13-27. Review.

Weissglas-Volkov D, Pajukanta P. Genetic causes of high and low serum HDL-cholesterol. *J Lipid Res.* 2010; 51(8):2032-57.

Zimmet P, Alberti KG, Kaufman F, Tajima N, Silink M, Arslanian S y cols. The metabolic syndrome in children and adolescents - an IDF consensus report. *Pediatr Diabetes.* 2007;8(5):299-306.

Apéndice I

CARTA INFORMATIVA

Como parte del proyecto de investigación titulado “**IDENTIFICACIÓN DE GENES ASOCIADOS AL DESARROLLO DE LA OBESIDAD EN LA POBLACIÓN MEXICANA**”, se realizó un estudio en niños y niñas que asistieron a la *Convivencia Infantil 2008, 2009 y 2010* que organiza la Secretaría de Salud. Los resultados obtenidos mostraron que casi el 50% de los niños participantes presentan sobrepeso u obesidad, siendo esta prevalencia aún mayor a la observada a nivel nacional. Además, alteraciones en los niveles de triglicéridos y colesterol fueron identificadas en más del 30% de estos niños.

Por lo que considerando la alta prevalencia de sobrepeso y obesidad observada en los niños y niñas participantes de la Convivencia Infantil de la SSA, y con ello, el riesgo elevado que tienen estos infantes de presentar obesidad en la edad adulta, así como trastornos metabólicos asociados a la obesidad tal es el caso de la hipertensión, dislipidemias (alteraciones en los niveles de colesterol y triglicéridos), hiperinsulinemia y alteración del metabolismo de la glucosa (diabetes), entre otros. Este año, la Unidad de Biología Molecular del Instituto Nacional de Ciencias Médicas y Nutrición Salvador Zubirán en colaboración con la *Dirección General de Recursos Humanos de la Secretaría de Salud* les invita nuevamente a los padres de familia o tutores a participar en este proyecto.

Es importante mencionar que gracias a su participación y los resultados obtenidos en el estudio, se han podido realizar modificaciones en el programa de la Convivencia Infantil, dirigidas todas ellas a mejorar la salud y bienestar de nuestros niños. Sin embargo, es necesario continuar evaluando los factores de riesgo metabólico, por lo que la participación de todos los niños y niñas que asisten a este evento es de gran relevancia (independientemente de su peso y talla).

Objetivo del estudio: Evaluar la prevalencia de obesidad y otros factores de riesgo metabólico asociados; e identificar genes asociados al desarrollo de la misma en población infantil mexicana.

Diseño del estudio

Una vez informado el padre o tutor del niño(a) y que este proporcione el consentimiento de participación de su hijo (a) en la investigación:

1. Se le pedirá que conteste un cuestionario sobre aspectos relacionados con actividad física, hábitos alimentarios (recordatorio de 24 hrs), y uso de medicamentos de su hijo (a) así como sobre el estatus socioeconómico familiar.

Como parte del cuestionario se pedirán datos que permitan localizar a las personas en el futuro, ya que se realizará la misma evaluación cada año (durante 3 años consecutivos) con el fin de verificar nuevamente el estado de salud de la población infantil.

2. Al niño (a) se le medirán los siguientes parámetros antropométricos: peso, estatura, circunferencia de cintura, de cadera y de muñeca; así como la presión arterial.
3. Se le medirá el porcentaje de grasa corporal a través impedancia (método no invasivo y estandarizado).
4. Se le realizará una sola punción venosa en la que se extraerán 15 ml. de sangre para determinar el perfil de lípidos (concentraciones plasmáticas de colesterol total, HDL, LDL y triglicéridos), estos resultados serán enviados a los padres o tutores al final de la Convivencia. LA TOMA DE MUESTRA SERÁ REALIZADA POR PERSONAL ALTAMENTE CALIFICADO DE LA SECRETARÍA DE SALUD PARA ESTUDIOS EN NIÑOS.

-Todos estos exámenes se consideran inofensivos y son procedimientos de rutina.

-En caso de cualquier dudas o comentarios, el padre o tutor podrá comunicarse con los Investigadores responsables del Proyecto: Dr. Samuel Canizales, M. en C. Blanca Estela López Contreras y M.en C. Olimpia Arellano al teléfono 56 55 00 11.

Criterios de inclusión:

El estudio se realizará en individuos que cubran los siguientes criterios:

1. Edad de 6 a 16 años.
2. No padecer enfermedades crónicas (principalmente cáncer y enfermedades mentales).

Criterios de exclusión:

1. Presentar enfermedad hepática, hipotiroidismo, albuminuria, niveles elevados de creatinina en suero (>2 mg/d).
2. Estar bajo terapia hormonal
3. Cualquier evento agudo como cirugía, infección, etc.
4. Pacientes que no deseen participar en el estudio.

Beneficios esperados

Los padres de los niños (as) obtendrán un diagnóstico nutricional y exámenes de laboratorio **gratuitos** que incluyen glucosa y perfil de lípidos completo. Asimismo, se dará atención nutricional en caso de requerirla.

Se espera que los resultados de este estudio proporcionen información sobre la participación de distintos genes de susceptibilidad relacionados a la obesidad en la población mexicana.

Riesgo para el paciente

El proyecto ha sido registrado y aceptado por el comité de investigación del Instituto Nacional de Ciencias Médicas y Nutrición Salvador Zubirán (INCMNSZ), con el número de referencia 1733.

El estudio está considerado de riesgo mínimo según la Ley General de Salud debido a la realización de una punción venosa para la toma de una muestra de 15 ml de sangre, la cual podría provocar un pequeño moretón o dolor; sin embargo, estos efectos se minimizan al usar la técnica estandarizada y personal altamente capacitado en el manejo y toma de muestras en población infantil.

La investigación no generará costo alguno para los participantes y éstos no recibirán remuneración alguna por su participación en el protocolo.

Apéndice II

ANEXO 1
CARTA DE CONSENTIMIENTO INFORMADO

**IDENTIFICACIÓN DE GENES ASOCIADOS AL DESARROLLO DE LA
OBESIDAD EN LA POBLACIÓN MEXICANA**

Yo _____ declaro libre y voluntariamente que

SI ACEPTO

NO ACEPTO

que mi hijo _____ participe en el proyecto para estudiar los genes asociados al desarrollo de obesidad en población mexicana, que se realiza a través de la colaboración entre el Instituto Nacional de Ciencias Médicas y Nutrición Salvador Zubirán y la Secretaría de Salud. También es de mi conocimiento que puedo retirar este consentimiento en cualquier momento si así lo deseo.

Entiendo que la muestra de sangre que done mi hijo para el proyecto (la cual se tomará en el Deportivo del Sindicato Nacional de Trabajadores al Servicio del Estado) servirá para determinar distintos factores de riesgo cardiometabólicos que aparecen desde edades tempranas, y que aumentan el riesgo a desarrollar obesidad y diabetes tipo 2 en el adulto; así como para estudiar los genes que pudieran estar relacionados con la obesidad y co-morbilidades asociadas. Se me ha explicado que esto no representa un riesgo adicional para la salud de mi hijo. También se me ha explicado que en el futuro, este estudio podría ayudar a identificar posibles formas de prevención, tratamiento y mejora de la calidad de vida de individuos con obesidad. Estoy consciente de que los resultados de la investigación son confidenciales y que se contestarán todas las dudas que pueda tener sobre el estudio.

Firma del Padre o Tutor

Firma del Investigador _____

Testigo 1 (firma) _____

Testigo 2 (firma) _____

México, D. F. a _____ de _____ del _____.

CUESTIONARIO PARA PADRES XXXVIII CONVIVENCIA INFANTIL

ANTECEDENTES PERSONALES PATOLÓGICOS DEL NIÑO (A). Favor de colocar una ✓ dentro del paréntesis.				
18. ¿El niño (a) padece alguna enfermedad crónica?	1.SI ()	2. NO ()	3.NO SABE ()	[]
19. ¿Cuál? _____				
20. ¿Toma algún medicamento para este padecimiento?	1.SI ()	2. NO ()	3.NO SABE ()	[]
21. ¿Cuál? _____				
22. ¿El niño (a) ronca cuando duerme?	1.SI ()	2. NO ()	3.NO SABE ()	[]
23. ¿Duerme con facilidad estando sentado durante el día?	1.SI ()	2. NO ()	3.NO SABE ()	[]
24. ¿Existen alteraciones del ciclo menstrual (frecuencia, ritmo, duración)?	1.SI ()	2. NO ()	3.NO SABE ()	[]

DATOS SOCIOECONOMICOS. Favor de colocar una ✓ dentro del paréntesis.							
25. Nombre de la madre: _____	Edad: _____ años		[] []				
26. ¿Asistió a la escuela?	1.SI ()	2.NO ()	Pase a la pregunta 28	[]			
27. Nivel de estudios:	1. Primaria ()	2. Secundaria ()	3. Preparatoria/técnica ()	4. Profesional ()	5. Posgrado ()	6. Otro ()	[]
28. Nombre del padre: _____	Edad: _____ años		[] []				
29. ¿Asistió a la escuela?	1.SI ()	2.NO ()	Pase a la pregunta 31	[]			
30. Nivel de estudios:	1. Primaria ()	2. Secundaria ()	3. Preparatoria/técnica ()	4. Profesional ()	5. Posgrado ()	6. Otro ()	[]
31. Número de personas que habitan la vivienda: _____				[] []			
32. ¿Cuál es el ingreso familiar mensual? _____							

NO LLENE LA SIGUIENTE SECCION, ESTAS SERAN RESPONDIDAS POR EL PERSONAL DE SALUD .

ANTROPOMETRIA	
33. Peso: _____ kg	37. Circunferencia cadera: _____ cm
34. Talla: _____ cm	38. Presión Arterial: _____ mmHg
35. Circunferencia muñeca: _____ cm	39. Resistencia: _____
36. Circunferencia cintura: _____ cm	40. Reactancia: _____

Indique con una el día que registrará: Lunes Martes Miércoles Jueves Viernes

INSTRUCCIONES: Por favor anote con el mayor detalle posible, **TODOS** los alimentos que consume su hijo (a) en el día elegido **EN CADA UNA DE LAS COMIDAS DEL DÍA**, así como los alimentos consumidos **ENTRE LAS COMIDAS**. No olvide anotar las cantidades aproximadas de azúcar, refrescos, galletas, chocolates, helados, agua endulzada, jugos, paletas, chicharrones, dulces, así como los alimentos que consume en **LA ESCUELA O EN LA CALLE**.

EJEMPLO: 250 ml de leche descremada con 2 cdas. de chocomilk, 1 pieza de pan dulce, 2 huevos estrellados con 1 cdita. de aceite de maíz, 2 tortillas de maíz, 1 naranja, 1 paleta de caramelo tutsi-pop, 1 lata de coca-cola, 4 tazas de palomitas de maíz.

Tiempo de comida	Alimentos consumidos	Cantidad de Alimento
DESAYUNO	_____	_____
Horario _____	_____	_____
Lugar _____	_____	_____
MEDIO DÍA	_____	_____
Horario _____	_____	_____
Lugar _____	_____	_____
COMIDA	_____	_____
Horario _____	_____	_____
Lugar _____	_____	_____
MEDIA TARDE	_____	_____
Horario _____	_____	_____
Lugar _____	_____	_____
COMIDA	_____	_____
Horario _____	_____	_____
Lugar _____	_____	_____

CUESTIONARIO DE FECUENCIA DE CONSUMO DE ALIMENTOS					
Favor de anotar en el paréntesis () la letra que corresponda a lo que su hijo (a) consume habitualmente					
A. Nunca o menos de 1 vez al mes		B. 1-3 veces al mes	C. 1 vez a la semana	D. 2-4 veces a la semana	
E. 5-6 veces a la semana		F. 1 vez al día	G. 2-3 veces al día	H. 4 ó más veces al día	
1	Un vaso de leche entera	()	19	Chorizo o longaniza	()
2	Queso manchego o Chihuahua	()	20	Pescado	()
3	Margarina (añadida a tus alimentos)	()	21	Carnitas	()
4	Mantequilla (añadida a tus alimentos)	()	22	Barbacoa	()
5	Un vaso con jugo de naranja o toronja	()	23	Sopes o quesadillas	()
6	Jitomate crudo o en ensalada	()	24	Hamburguesa	()
7	Papa o camote	()	25	Hot dogs	()
8	Papas a la francesa	()	26	Pizza	()
9	Lechuga, espinacas u otra verdura de hoja verde	()	27	Pan de dulce	()
10	Aguacate	()	28	Cereales de caja (tipo hojuelas de maíz, zucartitas, cornpops)	()
11	Frijoles	()	29	Hot cakes	()
12	Huevo	()	30	Refresco de cola (Coca Cola o Pepsi Cola, que no sea de dieta)	()
13	Pollo	()	31	Frutsi o boing	()
14	Jamón	()	32	Ate, miel, mermelada, cajeta o leche condensada	()
15	Carne de res	()	33	Tablilla de chocolate (tipo Hershey, Tin Larin, etc)	()
16	Carne de cerdo	()	34	Frituras (sabritas, doritos, fritos, sabritones, cazares, chicharrones)	()
17	Atún	()	35	Pastelito con relleno cremoso (gansito, submarino, pingüino, etc.)	()
18	Salchichas	()	36	Galletas (tipo lords, chokis, barritas, canelitas, etc.)	()

Apéndice IV

CUESTIONARIO DE ACTIVIDAD FÍSICA	
¿ CUÁNTO TIEMPO DEDICO SU HIJO (A) A ESTAS ACTIVIDADES DURANTE EL ÚLTIMO MES?	
(1) Nada (2) Menos de media hora a la semana (3) De media hora a 2 horas a la semana (4) De 2 a 4 horas a la semana (5) De 4 a 6 horas a la semana (6) 6 ó más horas a la semana	
JUGAR FÚTBOL	()
JUGAR VOLEIBOL	()
ANDAR EN BICICLETA	()
PATINAR O ANDAR EN PATINETA	()
JUGAR BÁSQUETBOL	()
BAILAR (incluyendo clases de baile como ballet, jazz, hawaiano)	()
LIMPIAR O ARREGLAR SU CASA	()
CAMINAR	()
CORRER	()
HACER GIMNASIA, AEROBICS, ETC.	()
NADAR	()
TENIS, FRONTENIS O FRONTÓN	()
JUEGOS COMO ENCANTADOS, HOYO, BOTE PATEADO, ETC	()
OTRA ACTIVIDAD O DEPORTE (especifique cual) _____	()
¿PARTICIPO EN ALGUN EQUIPO DEPORTIVO DENTRO O FUERA DE LA ESCUELA?	() SI ¿ En qué deporte? _____ () NO
EN UN DÍA DE LA SEMANA NORMAL	
¿ CUÁNTAS HORAS EN TOTAL VE SU HIJO (A) TELEVISIÓN AL DÍA? (sin contar el tiempo jugando video juegos o viendo películas en la dvd).	
(1) Nada (2) Menos de media hora al día (3) De media hora a 2 horas al día (4) De 2 a 4 horas al día (5) De 4 a 6 horas al día (6) 6 ó más horas al día	
LUNES	()
MARTES	()
MIÉRCOLES	()
JUEVES	()
VIERNES	()
SÁBADO	()
DOMINGO	()

(1) Nada	(2) Menos de una hora	(3) De 1 a 2 horas	(4) De 2 a 3 horas
(5) De 4 a 5 horas	(6) De 6 a 7 horas	(7) 8 ó más horas	
EN UN DÍA <u>ENTRE SEMANA</u> , CUÁNTAS HORAS VE PELÍCULAS O VIDEO EN DVD?		{ () }	
EN UN DÍA <u>ENTRE SEMANA</u> ¿CUÁNTAS HORAS JUEGA VIDEOJUEGOS (X-BOX, WI, ROCK BAND, ETC), U OTROS JUEGOS DE VIDEO O COMPUTADORA?		{ () }	
EN UN DÍA DE <u>FIN DE SEMANA</u> ¿CUÁNTAS HORAS VE PELÍCULAS O VIDEOS EN DVD?		{ () }	
EN UN DÍA DE <u>FIN DE SEMANA</u> ¿CUÁNTAS HORAS JUEGA VIDEO JUEGOS (X-BOX, WI, ROCK BAND, ETC), U OTROS JUEGOS DE VIDEO O COMPUTADORA?		{ () }	
Favor de colocar una en la opción quemás se adecúe a lo que su h o hace			
¿CUÁNTAS HORAS USA PARA HACER SU TAREA Y/O LEER UN DÍA <u>ENTRE SEMANA</u> ?		() Ninguna	[]
		() Menos de media hora	[]
		() De 1 a 2 horas al día	[]
		() 3 ó más horas al día	[]
EN UN DÍA DE <u>ENTRE DE SEMANA</u>		() Nada	[]
¿CUÁNTO TIEMPO PASA SENTADO EN COCHE, CAMIÓN O PESERO?		() Menos de 1 hora	[]
		() 1-2 horas	[]
		() 2-3 horas	[]
		() 3-4 horas	[]
		() 4 ó más horas	[]
¿A QUÉ HORA SE DUERME NORMALMENTE <u>ENTRE SEMANA</u> ?		() Antes de las 6	[]
		() Entre 6 y 7	[]
		() Entre 7 y 8	[]
		() Entre 8 y 9	[]
		() Entre 9 y 10	[]
		() Entre 10 y 11	[]
		() Después de las 11	[]
¿CUÁNTAS HORAS USA PARA HACER SU TAREA Y/O PARA LEER EN UN DÍA DE <u>FIN DE SEMANA</u> ?		() Ninguna	[]
		() Menos de media hora	[]
		() De 1 a 2 horas al día	[]
		() 3 ó más horas al día	[]
EN UN DÍA DE <u>FIN DE SEMANA</u>		() Nada	[]
¿CUÁNTO TIEMPO PASA SENTADO EN COCHE, CAMIÓN O PESERO?		() Menos de 1 hora	[]
		() 1-2 horas	[]
		() 2-3 horas	[]
		() 3-4 horas	[]
		() 4 ó más horas	[]
¿A QUÉ HORA SE DUERME NORMALMENTE LOS DÍAS DE <u>FIN DE SEMANA</u> ?		() Antes de las 6	[]
		() Entre 6 y 7	[]
		() Entre 7 y 8	[]
		() Entre 8 y 9	[]
		() Entre 9 y 10	[]
		() Entre 10 y 11	[]
		() Después de las 11	[]

Apéndice V

Debido a que las complicaciones asociadas a la obesidad como son el síndrome metabólico, la resistencia a la insulina, entre otros, aumentan durante la adolescencia. Se les solicita a los padres de familia llenar el siguiente cuestionario que nos permitirá evaluar la etapa de desarrollo en la que se encuentra su hijo o hija.

1. Si se trata de una niña, ¿ha presentado su primera menstruación? 1.SI () 2. NO () 3. NO SABE ()

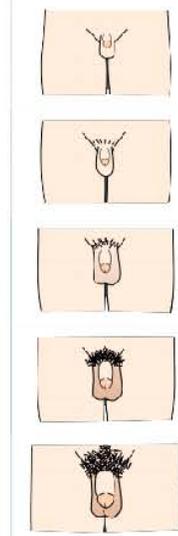
2. ¿A qué edad la presentó? _____ años _____ meses

Con ayuda de las figuras de abajo ubique en qué etapa de desarrollo se encuentra su niño(a) y márkelo con una X:

TANNER hombre

Cambios en el vello y genitales

- ETAPA 1
Vello y genitales infantiles
- ETAPA 2
Aumento de los testículos
Vello escaso en la base del pene
- ETAPA 3
Agrandamiento del pene
Escroto rugoso y pigmentado
- ETAPA 4
Aumento de los testículos y glande
Pigmentación escrotal
Vello de tipo adulto
- ETAPA 5
Genitales de tipo adulto
Vello adulto, extensión a muslos y línea alba
Vello de tipo adulto

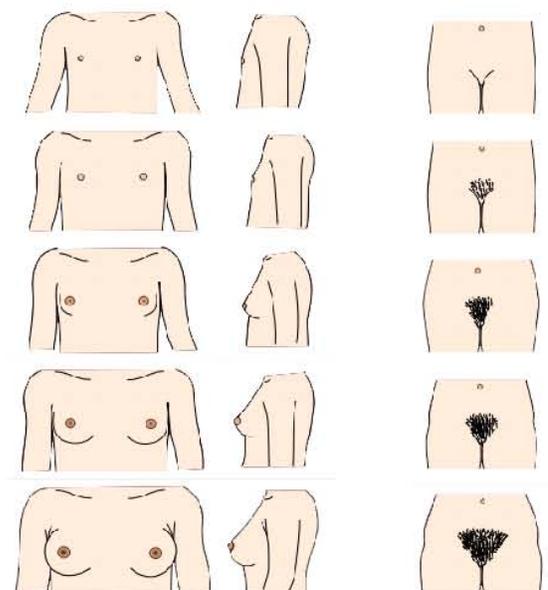


TANNER mujer

Cambios en los senos

Cambios en el vello púbico

- ETAPA 1
Mamas infantiles
Vello infantil
- ETAPA 2
Brote mamario. Areolas y pezones
Vello escaso en los labios.
- ETAPA 3
Elevación de mama y areola
Vello púbico rizado y oscuro
- ETAPA 4
Areola y pezón forman un montículo secundario que se proyecta desde el contorno de la mama que rodea
Vello de tipo adulto, pero cubre menor área
- ETAPA 5
Desarrollo mamario total
Vello adulto, extensión a cara interna de muslos



VNN1 Gene Expression Levels and the G-137T polymorphism are associated with HDL-C levels and Body Mass Index in Mexican Prepubertal Children.

Leonor Jacobo-Albavera, MSc, Pablo I. Aguayo-de la Rosa, BD, Hugo Villamil-Ramírez, MSc, Paola León-Mimila, MSc, Teresa Villarreal-Molina, MD, PhD, Blanca E. López Contreras, MSc, Sandra Romero-Hidalgo, PhD, Salvador Ramírez-Jiménez, BD, Fausto Sánchez-Muñoz, PhD, Rafael Bojalil, MD, PhD, Carlos A. Aguilar-Salinas MD, PhD, and Samuel Canizales-Quinteros, PhD

From Unit of Molecular Biology and Genomic Medicine, Instituto Nacional de Ciencias Médicas y Nutrición Salvador Zubirán (INCMNSZ) and Department of Biology, Facultad de Química, Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM) (L.J.-A., P.I.A.-R., H.V.-R., P.L.-M., B.E.L.-C., S.C.-Q.); Instituto Nacional de Medicina Genómica (T.V.-M., S.R.-H.); Department of Immunology; Instituto Nacional de Cardiología Ignacio Chávez (F.S.-M., R.B.); Department of Health Care. Universidad Autónoma Metropolitana Xochimilco (R.B.); Instituto de Investigaciones Biomédicas, UNAM (S.R.-J); Department of Endocrinology and Metabolism, INCMNSZ (C.A.A.-S.), México City, Mexico.

The first draft of this manuscript was written by L.J.-A., P.I.A.-R., T.V.-M. and S.C.-Q. No economical payment was given to them to produce the manuscript.

Corresponding and reprint request author:

Samuel Canizales-Quinteros Ph.D.

Department of Biology, Facultad de Química, Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM) and Unit of Molecular Biology and Genomic Medicine, Instituto Nacional de Ciencias Médicas y Nutrición Salvador Zubirán (INCMNSZ)

Vasco de Quiroga # 15 Colonia Sección 16. Tlalpan 14000. México D.F.

Tel. (00)(52)(55) 56-55-00-11

FAX (00)(52)(55) 56-55-00-11

E-mail: cani@servidor.unam.mx

Key Words: Genetics, Obesity, Lipoprotein, Childhood.

Short title: *VNN1* Gene Expression and G-137T polymorphism in children.

This research was supported by grant 85010 from Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT). The authors declare no conflict of interest.

ABSTRACT

OBJECTIVE: To evaluate whether *Vanin 1* (*VNN1*) gene expression levels and the G-137T polymorphism are associated with high density lipoprotein cholesterol (HDL-C) levels and other metabolic traits in Mexican prepubertal children.

STUDY DESIGN: We investigated 224 unrelated Mexican-Mestizo children aged 6-8 years (107 boys and 117 girls). The G-137T variant (rs4897612) was genotyped and *VNN1* mRNA expression levels were quantified in peripheral blood leukocytes.

RESULTS: In the total population, the T-allele was associated with lower *VNN1* mRNA expression levels ($P=2.7 \times 10^{-5}$), decreased HDL-C levels ($\beta= -6.19$, $P=0.029$) and with higher body mass index (BMI) z-score ($\beta= 0.48$, $P=0.024$). Moreover, in girls *VNN1* expression showed a positive correlation with HDL-C levels ($r^2= 0.219$; $P=0.018$) and a negative correlation with BMI z-score ($r^2= -0.256$; $P=0.005$).

CONCLUSION: Our data suggest that *VNN1* gene expression and the G-137T variant affect BMI and lipid traits (particularly HDL-C levels) in Mexican prepubertal girls. This is the first report of the participation of *VNN1* in BMI variation in humans.

Abbreviations and Acronyms

HDL-C High-density lipoprotein-cholesterol

VNN1 *Vanin 1* gene

BMI Body mass index

TG Triglyceride

TC Total cholesterol

hs-CRP High sensitivity C-reactive protein

HOMA-IR Homeostatic model assessment of insulin resistance

Introduction

High density lipoprotein cholesterol (HDL-C) levels regulation is a complex process where both genetic and lifestyle factors are involved.^{1,2} The accumulation effects of environmental exposure may increase the phenotypic variance of HDL-C levels mainly in adulthood; however, genetic factors may exert their HDL-C-lowering effect since childhood.³⁻⁵ Many gene variants affecting HDL-C levels have been identified through candidate gene/genome-wide association studies (GWAS) and replicated in different populations.⁶⁻⁸ Moreover, the association of several Single Nucleotide Polymorphisms (SNPs) with HDL-C levels identified in adults has been replicated in children.⁹

More recently, global quantitative gene expression analysis has been used to identify differentially expressed genes according to HDL-C levels.^{10,11} Göring et al¹² reported a positive correlation of *VNN1* expression levels in lymphocytes and HDL-C concentrations in Mexican-American adults, and a significant association of a functional polymorphism (G-137T, rs4897612) with both *VNN1* expression levels and HDL-C concentrations. Although there is no direct evidence of the role of the VNN1 protein in HDL-C level regulation, it is known that *VNN1* codes for pantetheinase and produces cysteamine, a potent antioxidant that prevents lipid peroxidation.^{13,14} *VNN1* has thus been considered as a reasonable candidate gene to modulate HDL-C levels. However, studies confirming this association have not been reported to date. We therefore decided to explore whether the G-137T variant and *VNN1* expression levels are associated with HDL-C levels and other metabolic parameters in Mexican prepubertal children.

Methods

We analyzed 224 healthy unrelated school-aged Mexican-Mestizo children (107 boys and 117 girls) aged 6 to 8 years, recruited from a summer camp for children of employees of the Mexican Health Ministry (Convivencia Infantil 2008, Secretaria de Salud). A questionnaire was applied and weight, height, waist circumference and blood pressure were measured in all participants. Body mass index (BMI) was calculated as weight in kilograms divided by height in meters squared. BMI z-scores were calculated using age and sex specific BMI reference data, as recommended by the Centers for Disease Control and Prevention.¹⁵ Fat mass percentage was measured using a bioelectric impedance method (Quantum X impedance analyzer, RJL Systems, Detroit, MI). None of the participants had evidence of diabetes, thyroid, renal or liver disease. A parent of each child signed the consent form for participation. The project was approved by the Institutional Committee of Biomedical Research in Humans of the Instituto Nacional de Ciencias Médicas y Nutrición Salvador Zubirán (INCMNSZ).

Biochemical parameters

Plasma glucose, total cholesterol (TC), triglyceride (TG), HDL-C, insulin and ApoA1 measurements were performed at the INCMNSZ with commercially available standardized methods as described by Villarreal-Molina et al.¹⁶ Total high sensitivity C-reactive protein levels (hs-CRP) were determined by immunonephelometry on a Beckman Coulter Immunochemistry System. The median anthropometric and biochemical parameters according to gender are shown in Table I. Hypoalphalipoproteinemia (HA) was defined as HDL-C levels < 40 mg/dL.¹⁷

VNN1 mRNA expression analysis

Total RNA was extracted from leukocytes using TRIzol (Invitrogen). To avoid DNA carryover, DNase treatment was performed with DNase I recombinant (Roche). To perform the expression analysis, 1000 ng of total RNA was reverse transcribed with TaqMan Reverse Transcription Reagents (Applied Biosystems) using random hexamers, according to the protocol recommended by the manufacturer. Real-time PCR was performed in a LightCycler 2.0 (Roche, Rotkreuz, Switzerland), using LNA TaqMan probes from the Universal Probe Library (Roche), in combination with intron-spanning specific primers as described previously.¹⁸ The following primers and probes were used to assess *VNN1* gene expression in human leukocytes: tcctgaggtgttgctgagtg (forward), agcgtccgtcagttgacac (reverse), and probe #80 (cat. no. 04689038001). Hypoxanthine phosphoribosyl transferase (*HPRT*) expression was measured as reference using *HPRT* primers tgatagatccattcctatgactgtaga (forward), caagacattcttccagttaaagttg (reverse), and probe #22 (cat. no. 04688961001); β -actin (*ACTB*) was measured as reference using Universal ProbeLibrary Human *ACTB* Gene Assay (cat. no. 05046165001). All assays showed linearity and a coefficient of variation <10%. Relative quantification of gene expression was calculated with the LightCycler Software 4.0.

Genotyping

Genomic DNA was extracted from peripheral blood leukocytes using a QIAamp DNA Blood Kit (Qiagen, Valencia, California). The *VNN1* G-137T variant was genotyped using the TaqMan assay C_29857881_10 (ABI Prism 7900HT Sequence Detection System; Applied Biosystems, Foster City, CA). No discordant genotypes were observed in 30 duplicate samples analyzed by direct sequencing. *VNN1* G-137T genotype frequencies were tested for Hardy-Weinberg equilibrium, deviation was not observed in any group.

Statistical Analysis

Differences in anthropometric and biochemical parameters according to gender were analyzed using Student's t-test. Correlations between *VNN1* gene expression and metabolic parameters were analyzed using Spearman's correlation coefficient. Differences in anthropometric and biochemical parameters according to G-137T genotype were tested by linear regression analysis adjusting for BMI z-score when appropriate. Associations were analyzed using recessive models for the T allele. Comparison of *VNN1* expression levels between G-137T genotypes was performed using Mann-Whitney U test. All statistical analyses were performed using SPSS version 15.0 (Chicago, IL) and a *P*-value of less than 0.05 was considered statistically significant. The study power to detect association of G-137T with HDL-C levels was estimated using the QUANTO software version 1.2,¹⁹ and reached > 80% statistical power.

Results

Anthropometric and biochemical characteristics

Hypoalphalipoproteinemia was observed in almost 20% of the prepubertal children. Fat mass percentage was significantly higher in girls ($P=0.041$), while fasting glucose levels were significantly higher in boys ($P=0.0004$) (Table I).

***VNN1* expression analysis**

VNN1 expression levels were not significantly correlated with HDL-C levels in the entire study population, but showed a significant negative correlation with BMI z-score, insulin, HOMA-

IR index and TG levels ($P=0.015$, 0.018 , 0.019 and 0.037 , respectively) (Table II). On stratification according to gender, a significant positive correlation of *VNN1* expression levels with HDL-C ($P=0.018$), and significant negative correlation with BMI z-score, insulin levels, and HOMA-IR index were observed exclusively in girls ($P=0.005$, 0.031 , and 0.026 , respectively).

G137T variant, *VNN1* expression levels and metabolic parameters

The overall frequency of the T-137 allele was 35%. The TT genotype was significantly associated with lower *VNN1* expression levels ($P=2.7 \times 10^{-5}$) (Figure 1). Multiple linear regression analyses to predict *VNN1* expression levels revealed that only TT genotype contributed independently to explain 4.8% of the variance at *VNN1* gene expression ($P=0.004$).

In addition, the TT genotype was associated with lower HDL-C and ApoA1 levels ($P=0.005$ and 0.044 , respectively), and with higher BMI z-score, percent fat mass, TG and TC levels in the whole sample ($P<0.05$, Table III). After adjusting for BMI z-core, only associations with TC and HDL-C remained significant in the whole sample ($P=0.033$ and 0.029 , respectively); the association with lower HDL-C remained significant only in girls ($P=0.010$).

Discussion

Several epidemiological studies report that the onset of metabolic disease is occurring at increasingly earlier ages.^{20,21} In the Mexican population, low HDL-C levels is the most common dyslipidemia both adults and adolescents.^{22,23} In the present study, we found that this dyslipidemia was also common in prepubertal children aged 6-8 years (20%), suggesting that low HDL levels are present since early childhood in this population.

Although environmental factors clearly play a role in the modulation of HDL-C levels,

genetic factors are known to be a major determinant of this trait.²⁴ Interestingly, some genes associated with HDL-C levels identified in recent GWAS have shown strong *cis* associations with transcript levels of nearby genes, suggesting that variation in expression is probably an important mechanism influencing HDL-C levels.²⁵ Through gene expression analyses, Göring et al.¹² observed that *VNN1* expression levels in lymphocytes correlated with HDL-C levels in Mexican-American adults ($r=0.28$, $P=4 \times 10^{-9}$). Similarly, we report here a positive correlation of *VNN1* expression levels in leucocytes with HDL-C serum levels only in prepubertal Mexican girls ($r=0.22$, $P=0.018$). We also observed a significant negative correlation of *VNN1* expression levels with BMI z-score, insulin, and with HOMA-IR in girls, which to our knowledge has not been previously reported. Earlier experimental evidence shows that cysteamine, which is produced by the action of Vanin inhibits 3-hydroxy-3-methylglutaryl-Coenzyme A (HMG-CoA) reductase decreasing cholesterol synthesis and possibly causing a shift towards fatty acid metabolism in hepatocytes.²⁶ Moreover, Bocos and Herrera²⁷ demonstrated that pantethine stimulates lipolysis in adipose tissue and inhibits cholesterol and fatty acid synthesis in the liver. These mechanisms are consistent with the correlations of *VNN1* expression levels with TG and HDL-C levels observed in the present study.

The *VNN1* T-137 allele frequency was high in the Mexican population (35%), and the TT genotype was significantly associated with lower *VNN1* expression, HDL-C and ApoA1 levels, in accordance with the findings of Göring et al.¹² in Mexican-American adults. In addition, we observed associations of the TT genotype with higher TG and TC levels in girls. However, these associations lost significance after adjusting for BMI z-score, suggesting they may be mediated by an effect on body fat. To our knowledge, there is no previous experimental evidence of the role of *VNN1* in human adipocyte function, however it was identified as an obesity-related gene in mice,²⁸ and is known to induce lipolysis in rat adipose tissue.²⁷ Additional studies are required to confirm and further understand the role of *VNN1* in human obesity.

The gender differences observed in this study are noteworthy, particularly because it involved prepubertal children. Mexican prepubertal girls showed significantly higher fat mass percentage than boys, which could explain at least part of the gender differences observed for genetic associations and correlations. Gender differences in the effect of polymorphisms on lipid traits have been previously observed in prepubertal children²⁹, apparently explained by dehydroepiandrosterone-sulfate (DHEA-S) level variation³⁰. Because we did not measure DHEA-S levels, we cannot rule out whether this factor modulates the effect of *VNN1* gene expression levels and the G-137T variant on metabolic traits in this study.

In conclusion, our data suggest that *VNN1* gene expression levels and the G-137T variant affect BMI and lipid traits (particularly HDL-C levels) in Mexican prepubertal girls. To our knowledge, this is the first report of the participation of *VNN1* in BMI variation in humans. Further studies are required to confirm these findings.

We thank Luz E. Guillén-Pineda (Department of Endocrinology and Metabolism, INCMNSZ) for her technical assistance. L.J.-A is supported by a doctoral scholarship from Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT) number 195399 at Programa de Doctorado en Ciencias Biomédicas from Universidad Nacional Autónoma de México. H.V.-R. is supported by a fellowship from CONACyT number 244112 at Programa de Doctorado en Ciencias Biológicas y de la Salud from Universidad Autónoma Metropolitana.

References

1. Qasim A, Rader DJ. Human genetics of variation in high-density lipoprotein cholesterol. *Curr Atheroscler Rep* 2006;8:198-205.
2. Lusis AJ, Fogelman AM, Fonarow GC. Genetic basis of atherosclerosis: part II: clinical implications. *Circulation* 2004;110:2066-71.
3. Dumitrescu L, Brown-Gentry K, Goodloe R, Glenn K, Yang W, Kornegay N, et al. Evidence for age as a modifier of genetic associations for lipid levels. *Ann Hum Genet* 2011;75:589-97.
4. Snieder H, van Doornen LJ, Boomsma DI. Dissecting the genetic architecture of lipids, lipoproteins, and apolipoproteins: lessons from twin studies. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 1999;19:2826-34.
5. Porkka KV, Viikari JS, Taimela S, Dahl M, Akerblom HK. Tracking and predictiveness of serum lipid and lipoprotein measurements in childhood: a 12-year follow-up. The Cardiovascular Risk in Young Finns study. *Am J Epidemiol* 1994;140:1096-110.
6. Willer CJ, Sanna S, Jackson AU, Scuteri A, Bonnycastle LL, Clarke R, et al. Newly identified loci that influence lipid concentrations and risk of coronary artery disease. *Nat Genet* 2008;40:161-69.
7. Kooner JS, Chambers JC, Aguilar-Salinas CA, Hinds DA, Hyde CL, Warnes GR, et al. Genome-wide scan identifies variation in MLXIPL associated with plasma triglycerides. *Nat Genet* 2008; 40:149-51.

- 8.- Kathiresan S, Melander O, Guiducci C, Surti A, Burtt NP, Rieder MJ, et al. Six new loci associated with blood low-density lipoprotein cholesterol, high-density lipoprotein cholesterol or triglycerides in humans. *Nat Genet* 2008;40:189-97.
- 9.- Flores-Dorantes T, Arellano-Campos O, Posadas-Sánchez R, Villarreal-Molina T, Medina-Urrutia A, Romero-Hidalgo S, et al. Association of R230C ABCA1 gene variant with low HDL-C levels and abnormal HDL subclass distribution in Mexican school-aged children. *Clin Chim Acta* 2010;411:1214-7.
- 10.- Ma J, Dempsey AA, Stamatiou D, Marshall KW, Liew CC. Identifying leukocyte gene expression patterns associated with plasma lipid levels in human subjects. *Atherosclerosis* 2007;191:63-72.
- 11.- Inouye M, Silander K, Hamalainen E, Salomaa V, Harald K, Jousilahti P, et al. An immune response network associated with blood lipid levels. *PLoS Genet* (2010). doi:10.1371/journal.pgen.1001113.
- 12.- Göring HH, Curran JE, Johnson MP, Dyer TD, Charlesworth J, Cole SA, et al. Discovery of expression QTLs using large-scale transcriptional profiling in human lymphocytes. *Nat Genet* 2007;39:1208-16.
- 13.- Yamazaki K, Kuromitsu J, Tanaka I. Microarray analysis of gene expression changes in mouse liver induced by peroxisome proliferator- activated receptor alpha agonists. *Biochem Biophys Res Commun* 2002;290:1114–22.
- 14.- Di Leandro L, Maras B, Schininà ME, Dupré S, Koutris I, Martin FM, et al. Cystamine restores GSTA3 levels in vanin-1 null mice. *Free Radic Biol Med* 2008;44:1088-96.

15.- Kuczmarski RJ, Ogden CL, Guo SS, Grummer-Strawn LM, Flegal KM, Mei Z, et al. 2000 CDC growth charts for the United States: methods and development. *Vital Health Stat* 2002;246:1–190.

16.- Villarreal-Molina MT, Aguilar-Salinas CA, Rodríguez-Cruz M, Riaño D, Villalobos-Comparan M, Coral-Vazquez R, et al. The ATP-binding cassette transporter A1 R230C variant affects HDL cholesterol levels and BMI in the Mexican population: association with obesity and obesity-related comorbidities. *Diabetes* 2007;56:1881-7.

17.- Expert Panel on Integrated Guidelines for Cardiovascular Health and Risk Reduction in Children and Adolescents. Expert panel on integrated guidelines for cardiovascular health and risk reduction in children and adolescents: summary report. *Pediatrics* 2011;128 Suppl 5:S213-56.

18.- Mouritzen P, Noerholm M, Nielsen PS, Jacobsen N, Lomholt C, Pfundheller HM, et al. ProbeLibrary: a new method for faster design and execution of quantitative real-time PCR. *Nat Methods* 2005;2:313–316.

19.- QUANTO Software [updated May 2009; cited 2012 March 16]. Available from: <http://hydra.usc.edu/GxE/>

20.- Saland JM. Update on the metabolic syndrome in children. *Curr Opin Pediatr* 2007;19:183-91.

21.- Nathan BM, Moran A. Metabolic complications of obesity in childhood and adolescence: more than just diabetes. *Curr Opin Endocrinol Diabetes Obes* 2008;15:21-9.

- 22.- Aguilar-Salinas CA, Olaiz G, Valles V, Torres JM, Gómez Pérez FJ, Rull JA, et al. High prevalence of low HDL cholesterol concentrations and mixed hyperlipidemia in a Mexican nationwide survey. *J Lipid Res* 2001;42:1298–307.
- 23.- Posadas-Sánchez R, Posadas-Romero C, Zamora-González J, Mendoza-Pérez E, Cardoso-Saldaña G, Yamamoto-Kimura L. Lipid and lipoprotein profiles and prevalence of dyslipidemia in Mexican adolescents. *Metabolism* 2007;56:1666–72.
- 24.-Weissglas-Volkov D, Pajukanta P. Genetic causes of high and low serum HDL-cholesterol. *J Lipid Res* 2010;51:2032-57.
- 25.-Cookson W, Liang L, Abecasis G, Moffatt M, Lathrop M. Mapping complex disease traits with global gene expression. *Nat Rev Genet* 2009;10:184-94.
- 26.-Cighetti G, Del Puppo M, Paroni R, Galli Kienle M. Modulation of HMG-CoA reductase activity by pantetheine/pantethine. *Biochim Biophys Acta* 1988;963:389-93.
- 27.- Bocos C, Herrera E. Pantethine stimulates lipolysis in adipose tissue and inhibits cholesterol and fatty acid synthesis in liver and intestinal mucosa in the normolipidemic rat. *Environ Toxicol Pharmacol* 1998;6:59-66.
- 28.- Schadt EE, Lamb J, Yang X, Zhu J, Edwards S, Guhathakurta D, et al. An integrative genomics approach to infer causal associations between gene expression and disease. *Nature Genet* 2005;37:710-7.
- 29.- López-Simón L, de Oya M, Lasunción MA, Riestra P, Benavente M, de Oya I, et al. Genetic determinants of plasma HDL-cholesterol levels in prepubertal children. *Clin Chim Acta* 2009;403:203-6.

30.- Garcés C, Benavente M, Cano B, Viturro E, Ortega H, Horcajada C, et al. Effects of dehydroepiandrosterone-sulfate on the ApoE genotype influence on plasma lipid levels in prepubertal children. *J Clin Endocrinol Metab* 2003;88:3997–4000.

Figure 1. Effect of the G-137T variant on the expression levels of *VNN1* in Mexican prepubertal children. The results are presented as the global mean \pm the standard error ($P=2.7 \times 10^{-5}$).

Table I. Anthropometric and biochemical parameters according to gender

Characteristic	Total subjects (224)	Boys (107)	Girls (117)	p ^a
Age, years	8.0 (7.0-8.7)	8.0 (7.0-8.8)	7.7 (7.0-8.4)	0.194
BMI z-score	1.1 (0.3-1.7)	1.0 (0.3-1.8)	1.1 (0.2-1.7)	0.846
FM, %	29.5 (22.1-37.8)	26.9 (20.0-37.9)	31.5 (23.2-37.6)	0.041
Glucose, mg/dL	88.0 (84.0-92.0)	89 (86.0-94.0)	87 (83-90)	0.0004
Insulin, μ U/mL	4.7 (3.1-7.5)	4.8 (3.2-6.7)	4.6 (2.9-8.3)	0.533
HOMA-IR	1.0 (0.7-1.6)	1.1 (0.7-1.4)	1.0 (0.6-1.8)	0.801
hs-CRP, mg/L	0.9 (0.4-2.0)	0.9 (0.2-2.0)	1.1 (0.5-2.1)	0.238
TG, mg/dL	89.0 (59.0-118.0)	87.0 (55.0-112.0)	91.0 (60.0-130.0)	0.087
TC, mg/dL	175.0 (156.3-193.0)	174.0 (155.0-189.0)	176.0 (158.0-200.0)	0.261
HDL-C, mg/dL	48.0 (41.0-56.0)	48.0 (42.0-57.0)	48.0 (40.0-55.0)	0.442
ApoA1, mg/dL	167.0 (154.0-183.25)	168.0 (157.0-186.0)	166.0 (152.0-180.0)	0.120
HA (%)	19.6	16.8	22.2	0.310 ^b

Data are the medians (interquartile range) or n (%). BMI, body mass index; FM, percent fat mass; HOMA-IR, homeostatic model assessment of insulin resistance; hs-CRP, high sensitivity C-reactive protein; TG, triglyceride; TC, total cholesterol; HDL-C, high-density lipoprotein cholesterol; HA, hypoalphalipoproteinemia. ^a P-values were calculated by *t*-test; ^b χ^2 test.

Table II. Correlation of *VNN1* mRNA levels in leukocytes with metabolic phenotypes.

Metabolic phenotypes	<i>Whole Population</i> (<i>n</i> =224)		<i>Boys (n=107)</i>		<i>Girls (n=117)</i>	
	<i>r</i>	<i>P</i>	<i>r</i>	<i>P</i>	<i>r</i>	<i>P</i>
BMI z-score	-0.163	0.015	-0.049	0.617	-0.256	0.005
FM, %	-0.129	0.050	-0.087	0.380	-0.147	0.115
Glucose, mg/dL	-0.064	0.340	-0.041	0.676	-0.125	0.179
Insulin, μ U/mL	-0.161	0.018	-0.068	0.499	-0.204	0.031
HOMA-IR	-0.160	0.019	-0.065	0.519	-0.211	0.026
hs-CRP, mg/L	0.065	0.348	0.176	0.078	-0.005	0.961
TG, mg/dL	-0.139	0.037	-0.060	0.542	-0.171	0.065
TC, mg/dL	-0.043	0.524	-0.031	0.753	-0.030	0.747
HDL-C, mg/dL	0.088	0.188	-0.086	0.378	0.219	0.018
ApoA1, mg/dL	0.075	0.281	-0.055	0.600	0.142	0.131

BMI, body mass index; FM, percent fat mass; HOMA-IR, homeostatic model assessment of insulin resistance; hs-CRP, high sensitivity C-reactive protein; TG, triglyceride; TC, total cholesterol; HDL-C, high-density lipoprotein cholesterol.

Table III. Association of G137T variant with metabolic parameters stratified by gender

Parameters	All children (n=224)			Boys (n=107)			Girls (n=117)		
	Effect (SE)	<i>P</i>	<i>P</i> ^a	Effect (SE)	<i>P</i>	<i>P</i> ^a	Effect (SE)	<i>P</i>	<i>P</i> ^a
BMI z-score	0.48 (0.21)	0.024	-	0.69 (0.36)	0.061	-	0.38 (0.26)	0.146	-
FM, %	5.66 (2.25)	0.012	-	6.45 (4.24)	0.131	-	4.56 (2.46)	0.067	-
Glucose, mg/dL	-1.84 (1.39)	0.189	0.063	-0.38 (2.28)	0.869	0.392	-2.07 (1.70)	0.225	0.160
Insulin, μ U/mL	1.64 (1.15)	0.157	0.536	2.52 (1.65)	0.130	0.348	1.01 (1.62)	0.534	0.921
HOMA-IR	0.33 (0.26)	0.207	0.677	0.52 (0.39)	0.188	0.499	0.21 (0.36)	0.570	0.971
hs-CRP, mg/L	0.66 (0.37)	0.079	0.158	0.67 (0.58)	0.254	0.277	0.60 (0.50)	0.230	0.428
TG, mg/dL	25.76 (12.45)	0.040	0.205	-1.65 (17.63)	0.926	0.351	39.53 (17.34)	0.024	0.075
TC, mg/dL	16.35 (6.58)	0.014	0.033	10.64 (10.41)	0.309	0.485	18.93 (8.64)	0.031	0.059
HDL-C, mg/dL	-6.19 (2.20)	0.005	0.029	-2.10 (3.62)	0.562	0.980	-8.47 (2.80)	0.003	0.010
ApoA1 mg/dL	-9.66 (4.77)	0.044	0.093	-5.95 (8.72)	0.497	0.966	-12.44 (5.98)	0.040	0.089

Effect values are presented as effect for two T copies, standard error (SE). FM, percent fat mass. Genotype frequencies: all children (GG, 41.1% ; GT, 47.8%; TT, 11.2%); boys (GG, 42.1% ; GT, 49.5%; TT, 8.4%); girls (GG, 40.2% ; GT, 46.2%; TT, 13.7%).

^a*P*-values adjusted for BMI z-score.

