



**UNIVERSIDAD NACIONAL
AUTÓNOMA DE MÉXICO**

**FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES
ZARAGOZA**

*ASOCIACIÓN DE POLIMORFISMOS EN EL GEN SOCS3
CON EL RIESGO A PADECER OBESIDAD EN PACIENTES
MEXICANOS*

TESIS

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE

QUÍMICA FARMACÉUTICA BIÓLOGA

PRESENTA

MORALES RIVERA MONSERRAT IVONNE

DIRECTORA DE TESIS:

M. en C. Yolanda Saldaña Álvarez

ASESORA DE TESIS:

Dra. Raquel Retana Ugalde



México, D.F.

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.

Esta tesis se llevó a cabo para la obtención de grado de Licenciatura en Química Farmacéutico Biológica, en la Facultad de Estudios Superiores Zaragoza, Universidad Nacional Autónoma de México, bajo la asesoría de la Dra. Raquel Retana Ugalde.

Así mismo, el presente trabajo fue realizado en el laboratorio de Inmunogenómica y enfermedades metabólicas del Instituto Nacional de Medicina Genómica, Secretaría de Salud, bajo la supervisión de la Dra. Lorena Orozco Orozco, jefe del laboratorio, la dirección de la M. en C. Yolanda Saldaña Álvarez, coordinadora del proyecto de Obesidad, y la asesoría de la M. en C. Guadalupe Salas Martínez, ambas investigadoras en Ciencias Médicas del mencionado Instituto.

No te quedes inmóvil

al borde del camino

no congeles el júbilo

no quietas con desgana

no te salves ahora... ni nunca

No te salves

no te llenes de calma

no reserves del mundo

sólo un rincón tranquilo

no dejes caer los párpados

pesados como juicios

no te quedes sin labios

no te duermas sin sueño

no te pienses sin sangre

no te juzgues sin tiempo...

pero si... pese a todo

no puedes evitarlo...

...y congelas el júbilo

y quietas con desgana

y te salvas ahora

y te llenas de calma

y reservas del mundo

sólo un rincón tranquilo

y dejas caer los párpados

pesados como juicios

y te secas sin labios

y te duermes sin sueño

y te piensas sin sangre

y te juzgas sin tiempo

y te quedas inmóvil

al borde del camino

y te salvas

entonces...

...no te quedes conmigo.

No te salves

Mario Benedetti

A mi madre y a mi hermano.

AGRADECIMIENTOS

A mi manager, mi mami, María del Rocío Rivera González, creadora y dadora de vida. Un gracias es una palabra mediocre para demostrar mi agradecimiento, prefiero continuar retribuyéndotelo con hechos.

A mi hermano Alfredo López Rivera, ejemplo incomparable de humildad y amor incondicional. Gracias por amarme tanto desde niña (aunque querías hermanito), por tus inauditos sacrificios, por aguantar mis arranques. Siempre quise ser como tú... GRACIAS por ser el mayor de mis ejemplos.

A mi padre Ricardo Rafael Morales López, por darme la vida, por alimentarme, vestirme y orientarme en la elección de mi carrera, por heredarme esa practicidad y buen sentido del humor ante los problemas de la vida, por hacerme reír durante mi infancia y ser un ejemplo de intelectualidad.

A mi mejor amigo Héctor Palma Arellano, por creer en mí, por saber quién soy sin tener que decirle algo, por tomarse el tiempo para entenderme y ayudarme a mejorar como ser humano, hija y profesionista. Por ser ejemplo de tenacidad, constancia, superación, sensatez, sinceridad y solidaridad. Por exigirme afectuosamente a ver más allá y a no limitarme. Por esos pasos de baile y charlas agradables. Por tenerme paciencia y ver en mí lo que probablemente nadie ha podido ver. Gracias.

A las "Brujas", "Locas" o "Club de las Feas" y demás apodos que en un futuro puedan adjudicarse (Maldonado). Anabel Zúñiga Martínez, Angélica A. Quinto Villalobos, Ana Laura Vázquez González, Elizabeth Galeana Luna, Fabiola Cruz Pérez, Maricela López Torres, Migdalia Vargas Ramírez, Paulina E. Galicia Pérez. Por darle un colorido sentido a la amistad. Por ser literalmente unas niñas burlonas, simples y alivianadas pero al mismo tiempo mujeres inteligentes y ambiciosas, llenas de proyectos y practicantes de valores como la lealtad y la fraternidad. Sin ustedes me hubiera convertido en una "amargator" desde hace algún tiempo.

A Ana "Mike" por haberme brindado su amistad a pesar de lo dispersa que a veces parezco, por ser un ejemplo de luchadora que emprende cada uno de sus proyectos pensando en el bienestar de más de una persona. Por ejemplificarme cada día que se puede practicar la nobleza y la humildad, y por ese viaje inolvidable a Cuba.

Al gran amigo Víctor López Devesa†... aquí andó mi psycho favorito... GRACIAS por dedicarte a ser el doctor de mucha gente y entre las afortunadas mi familia. Gracias por haber ayudado tanto a mi madre, sin esa ayudota Yo no sería lo que soy. Gracias por escucharnos y darme una visión distinta de mi profesión. Sé que sabes que lo logré, sé que sabes que lograré más. Al fin de cuentas "la materia no se crea ni se destruye sólo se transforma".

A Rodrigo Alberto Elizalde Martínez (Rocko), por haber sido y estado. A Emilio M. Durán Manuel por ser Emily Rose y aún hablarme después de 11 años de amistad.

Un especial agradecimiento a los investigadores del INMEGEN, M. en C. Yolanda Saldaña Álvarez por guiarme e introducirme en el camino de la investigación experimental, además de dedicarle tiempo y paciencia al mejoramiento del proyecto. A la M. en C. Guadalupe Salas Martínez por compartir conmigo sus conocimientos y ser intermediaria para mi entrada al INMEGEN. A la Dra. Lorena Orozco Orozco por haberme aceptado en el laboratorio y por el tiempo brindado en la revisión y mejoramiento de mis trabajos. A la Dra. Silvia Jiménez Morales por su aceptación y siempre buen sentido del humor y al Q.F.B. Juan Jiménez.

A mi instructor y ejemplo práctico de ética profesional y humanismo M. en C. y Médico Epidemiólogo Marcelino Esparza, por enseñarme las técnicas básicas, darme los tips, tenerme paciencia y trabajar siempre con honestidad y profesionalismo.

A mis compañeros estudiantes del INMEGEN, tocaya Monse Carrera, Ruth, Lucía Méndez. Humberto García, Humberto, Nadia, Mirna y Franco por hacerme sentir en un ambiente agradable en el laboratorio.

A mis ex instructores del Servicio Social en el Servicio de Genética del Hospital General de México, O.D. M. en C. Alicia Cervantes, Q.F.B. Adrian Pérez, Q.F.B. Adriana y M. en C. Georgina, por haberme inducido en un campo muy bonito de la genética: la citogenética, ya que en este lugar se incrementó mi interés y amor por esta ciencia y contemplé directamente los efectos que ésta puede tener en los seres humanos y en su sociedad. Este lugar me hizo reflexionar y darme cuenta de que a pesar de todas las nuevas tecnologías, se necesita además mucha mano de obra en el campo de la investigación en México para seguir aportando granitos de arena al costal.

A mis tíos Rivera González: Ana, Dalila †, Lucila, María Eugenia, Rosario, Jaime y Ricardo. Por ser parte de mi vida e indicarme el camino de lo que debo y no debo hacer. A mi tía Carmen Escalante, ejemplo de inteligencia y diplomacia.

A mis madrinas Luz María Gutiérrez Pineda y Guadalupe Pineda Gálvez por sus consejos claves en la formación de mi infancia y adolescencia y por demostrarme que no importando las circunstancias siempre se debe luchar para mejorar la calidad de vida.

A mis primates Rivera: Henry, Huicho, Adriana, Fer, Julieta, Sarahí, Ana, Zac, Itza, Betzabé, Eunice y Damaris, (los más grandotes), por haberme brindado la confianza para contar con ustedes, por sus palabras de aprobación y desaprobación, por haber jugado conmigo y darme siempre el lugar de "LA DE CHOCOLATE". A Ricky por salvarme de ser la más pequeña.

A mi cuñada Mabelle Paola Zarate, por amar a mi hermano y aceptarnos a mí y toda la familia Rivera, dentro de su vida.

A mis ex compañeros y aún amigos de la COFEPRIS, Gabriela Sánchez Aquino, Madaí González, Alma Rosa González Zuñiga, Judith Sierra, David González G., Misael Aquino, por echarme porras cuando me salí y continuar brindándome su amistad.

Un especial agradecimiento al Director Ejecutivo de Autorización de Productos y Establecimientos de la COFEPRIS, Marco Antonio Arias Vidaca, por haberme aceptado en ese empleo, que me sirvió para renovar mi visión acerca de la Genética y por haberme echado porras durante mi estancia en esa Comisión.

A la Directora del colegio Rosas del Tepeyac por darme todos esos chances para irme a seminarios, simposios, congresos y a las revisiones de mi tesis. Por entender mi situación y contribuir a que exista una profesionista más en este país. A las profesoras Moní, Lulú y Estelita por darme una perspectiva distinta de la educación, y por su puesto a mis HUMANITOS adorados, por enseñarme cada día algo distinto, pero sobre todo, que se puede vivir sin rencor en el corazón. MIL GRACIAS.

A las personas que recientemente han entrado en mi vida y no les he podido dedicar el tiempo que se merecen por andar del “tingo al tango”.

A mis abuelos Rosario† y José†.

Al Instituto Politécnico Nacional, que desde que inicié mis pininos en la Química me ha brindado educación de extrema calidad, pero lo más importante ha FORJADO mi carácter profesional.

A la Universidad Nacional Autónoma de México, por abrirme sus puertas, y hacerme ver el otro lado de la moneda. Por demostrarme que existe el compañerismo, la solidaridad, el respeto y la tolerancia.

A mi país, México, por el ser el motor de mis convicciones y el sustento de mis proyectos. Gracias México por hacerme ver hasta en las peores situaciones que vale la pena luchar por tu cálido cielo, tus dulces aguas, por el color de tu tierra, por la bondad de tu gente, por ti México. GRACIAS.

A mis ídolos de ciencia, política y literatura, porque su obra ha dejado un legado de idealismo en mí...

...y a todas las personas que directa o indirectamente han contribuido a ser lo que soy... GRACIAS TOTALES.

POR MI RAZA HABLARÁ EL ESPÍRITU

Q.F.B. Monserrat Ivonne Morales Rivera

CONTENIDO	Pág
LISTA DE ABREVIATURAS.....	X
LISTA DE FIGURAS	XII
LISTA DE TABLAS.....	XIII
RESUMEN	1
1. INTRODUCCIÓN	2
2. MARCO TEÓRICO.....	3
2.1 Definición de obesidad	3
2.2 Antecedentes genéticos	3
2.3 Parámetro de medición	4
2.4 Clasificación de la obesidad	5
2.5 Abordaje de estudio	5
2.6 Etiología de la obesidad	6
2.7 Gen SOCS3 y su relación con la obesidad.	10
3. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA	16
4. OBJETIVOS	17
4.1 Objetivo General	17
4.2 Objetivos Particulares.....	17
5. HIPÓTESIS DE INVESTIGACIÓN	18
6. DISEÑO EXPERIMENTAL.....	19
6.1 Tipo de estudio.....	19
6.2 Población de estudio	19
6.3 Diseño y tamaño de la muestra	19
6.4 Criterios de inclusión, exclusión y eliminación.....	19

6.5 Variables	21
6.6 Técnicas	22
6.6.1 Estrategia general	22
6.6.2 Estudio molecular	27
6.7 Diseño estadístico	32
7. RESULTADOS	33
7.1 Características fenotípicas de la población	33
7.2 Características genotípicas de la población	38
8. DISCUSIÓN	48
9. CONCLUSIONES.....	51
10. PROPUESTAS Y RECOMENDACIONES	52
ANEXO 1	53
ANEXO 2.....	62
ANEXO 3.....	65
11. REFERENCIAS.....	67

LISTA DE ABREVIATURAS

°C	Grados Celcius
∞	Infinito
ADN	Ácido desoxirribonucleico
C	Concentración
Chr	Cromosoma
D.E.	Desviación Estándar
DMT2	Diabetes Mellitus tipo 2
ECNT	Enfermedades Crónicas No Transmisibles
EDTA	Ácido Etilendiaminotetraacético
E-HW	Equilibrio de Hardy Weinberg
ENSANUT	Encuesta Nacional de Salud y Nutrición
FAM	Marcador fluorescente FAM ®
G-WAS	Escaneo Amplio del Genoma
IC	Intervalo de Confianza
IMC	Índice de Masa Corporal
INMEGEN	Instituto Nacional de Medicina Genómica
JAK	Cinasa Janus
Kg	Kilogramos
LEPRb ó ObR	Receptor de la Leptina b
m	masa
MAF	Alelo de Frecuencia Menor

MGB	Partícula de Unión al Surco Menor
N	Población total
n	Fracción de la población
NCBI	Centro Nacional sobre Información en Biotecnología
OB	Obesidad
OMS	Organización Mundial de la Salud
OR	Oportunidad Relativa
p	Nivel de Significancia
PCR	Reacción en Cadena de la Polimerasa
QTL	Loci de Rasgos Cuantitativos
RCLB	Buffer de Lisis de Células Rojas
rpm	revoluciones por minuto
SNPs	Polimorfismos de un solo nucleótido
SOCS	Supresor de la Señalización de Citoquinas
STAT	Transductor de Señales y Activador de la Transcripción
T _m	Temperatura de fusión
UTR	Región no traducida
V	Volumen
VIC	Marcador fluorescente VIC™
WCLB	Buffer de Lisis de Células Blancas
X ² o chi ²	Prueba de ji cuadrada

LISTA DE FIGURAS

Figura 2.1. Regulación fisiológica del balance de energía.	8
Figura 2.2 Isoformas del receptor de la leptina.	9
Figura 2.3. Esquema de señalización intracelular de la leptina en el hipotálamo.....	11
Figura 2.4. Mecanismo alternativo de regulación de SOCS sobre la vía JAK/STAT.	12
Figura 2.5. Mecanismo propuesto de resistencia a la leptina.....	14
Figura 6.1 Gen SOCS3 y ubicación de los polimorfismos de un solo nucleótido analizados en este estudio.....	24
Figura 6.2. Diagrama de flujo (Algoritmo metodológico).	26
Figura 6.3. Esquema general de genotipificación del ADN.	30
Figura 6.4. Plot de discriminación alélica generado por el software SDS 2.2 ®.....	31
Figura 6.5 Software de evaluación del Equilibrio de Hardy Weinberg.....	32
Figura 7.1. Porcentaje de hombres y mujeres casos analizados en el estudio.	34
Figura 7.2. Porcentaje de los diversos grados de obesidad en hombres y mujeres..	35
Figura 7.3. Frecuencia del haplotipo CAC en casos y controles.	46
Figura 7.4. Plot de haplotipos del software Haploview®.	47

LISTA DE CUADROS

Cuadro 2.1. Estudios de asociación de SNPs del gen SOCS3, con obesidad en diversas poblaciones.....	15
Cuadro 6.1 Definición de variables.....	21
Cuadro 6.2. Secuencia de las sondas utilizadas en la identificación de polimorfismos en el gen SOCS3.	25
Cuadro 7.1 Porcentaje de casos y controles estratificados por sexo analizados en el estudio.....	34
Cuadro 7.2 Prevalencia de obesidad en hombres y mujeres estratificada por gravedad.	35
Cuadro 7.3. Analogía de los resultados arrojados en esta tesis contra los presentados por ENSANUT 2006.	36
Cuadro 7.4. Edad promedio prevalente en controles y casos estratificados por gravedad.	37
Cuadro 7.5. Frecuencia genotípica de los polimorfismos rs7221341, rs4969168 y rs9914220, presentada en casos y controles.....	39
Cuadro 7.6. Analogía entre las frecuencias alélicas menores de la población incluida en este estudio y las de otras poblaciones.....	40
Cuadro 7.7. Frecuencia alélica menor para cada polimorfismo en estudio.	42
Cuadro 7.8. Asociación entre polimorfismos del gen SOCS3 y pacientes estratificados por gravedad y género.	42
Cuadro 7.9. Asociación alélica y genotípica el SNP rs4969168 (G/A) del gen SOCS3 en pacientes masculinos con obesidad II y controles.....	43
Cuadro 7.10. Asociación alélica y genotípica del SNP rs9914220 (C/T) del gen SOCS3 en pacientes femeninos con obesidad y controles.....	44
Cuadro 7.11. Frecuencia de las diversas combinaciones posibles de haplotipos.....	45

Cuadro 7.12. Asociación del haplotipo CAC con los grados más graves de obesidad
..... 47

RESUMEN

Justificación. La existencia de heterogeneidad genética entre las poblaciones ha demandado establecer en cada una la aportación genética en el desarrollo de la obesidad, entidad que se ha convertido en un problema creciente de salud pública en México y el mundo.

Objetivo. Determinar si polimorfismos de un sólo nucleótido (SNPs) localizados en el gen *SOCS3* se asocian al riesgo a padecer obesidad en pacientes mexicanos.

Material y métodos. Se realizó un estudio de casos (600) y controles (378). El diagnóstico de obesidad se basó en el Índice de Masa Corporal. Se analizaron 4 SNPs en el gen *SOCS3*, mediante la técnica de discriminación alélica fluorescente de 5' exonucleasa (TaqMan) a partir de ADN de sangre periférica. La asociación con obesidad se estimó mediante las pruebas estadísticas χ^2 o exacta de Fisher y las estimaciones de riesgo con razón de momios con intervalo de confianza al 95 %.

Resultados. Las frecuencias alélicas de los polimorfismos en diversas poblaciones mostraron similitudes (residentes de los Ángeles con ascendencia mexicana y europeos) y diferencias (Yorubas de Nigeria y afroamericanos) con respecto a lo reportado por HAPMAP. De los 4 SNPs analizados, dos mostraron asociación a obesidad: rs4969168 (AA) en pacientes masculinos con riesgo a obesidad grado II, OR=4.136 [0.959-17.847], p=0.04218; y rs9914220 (TT) en pacientes femeninos, OR=0.290 [0.086-0.979], p=0.03468. El haplotipo CAC mostró asociación al riesgo de padecer una obesidad más grave (IMC>35), OR=1.99 [1.23-3.23], p=0.0029.

Conclusiones. La población femenina presenta mayor susceptibilidad a padecer una obesidad más grave. Las frecuencias alélicas de los polimorfismos analizados en este proyecto presentaron una frecuencia similar a la observada en otras poblaciones. Además, los SNPs rs4969168 y rs9914220 mostraron asociación a riesgo y protección, respectivamente, a obesidad y se encontró una correlación entre los polimorfismos con el grado y el género.

1. INTRODUCCIÓN

La obesidad es reconocida actualmente como uno de los retos más importantes de Salud Pública en el mundo, dada su prevalencia, su difícil control y al impacto que ésta tiene en el riesgo a padecer enfermedades crónicas no transmisibles (ECNT).^[1]

Los datos más recientes de la Organización Mundial de la Salud (OMS), indican que:

- En 2008, 1500 millones de adultos (de 20 y más años) tenían sobrepeso. Dentro de este grupo, más de 200 millones de hombres y cerca de 300 millones de mujeres son obesos.
- El 65% de la población mundial vive en países donde el sobrepeso y la obesidad cobran más vidas que la insuficiencia ponderal.
- En 2010, alrededor de 43 millones de niños menores de cinco años tenían sobrepeso.
- El sobrepeso y la obesidad son el quinto factor principal de riesgo de defunción en el mundo.
- Cada año fallecen por lo menos 2,8 millones de personas adultas como consecuencia del sobrepeso o la obesidad.

Anteriormente, se consideraba a la obesidad como un problema exclusivo de los países de altos ingresos, sin embargo, actualmente el sobrepeso y la obesidad están aumentando espectacularmente en los países de ingresos bajos y medios, sobre todo en el medio urbano.^[2]

Actualmente, México ocupa el segundo lugar de prevalencia mundial de obesidad, después de Estados Unidos de Norteamérica. Esto representa un problema de salud pública prioritario que exige la puesta en marcha de una política nacional en todos los niveles que establezca y atienda el origen multifactorial del problema.^[1]

2. MARCO TEÓRICO

2.1 Definición de obesidad

La obesidad se define como una acumulación anormal o excesiva de grasa corporal, originada por un balance energético positivo mantenido en el tiempo, según su grado y especialmente su duración, puede transformarse en una enfermedad. En las últimas décadas, los cambios sociales y económicos, resultado del proceso de globalización, han puesto a disposición productos comestibles con alto contenido en grasa, además de favorecer el sedentarismo en la población urbanizada, generando un ambiente obesogénico y favoreciendo así el incremento de su incidencia.^[2]

2.2 Antecedentes genéticos

Estudios en familias, gemelos e hijos en adopción, confirman que en la etiología de la obesidad, además de los factores ambientales existe una importante contribución de factores genéticos en el desarrollo de este padecimiento. Actualmente, se ha establecido que la obesidad es una enfermedad multifactorial compleja que se desarrolla por la interacción de múltiples alelos de susceptibilidad y el medio ambiente. Se ha documentado que el riesgo a desarrollar obesidad entre los hermanos de pacientes con obesidad grado III, es hasta 7-8 veces el de la población general y que la heredabilidad (fracción de la enfermedad que puede ser atribuida a los genes) oscila entre 40 y 70%.^[3,4]

El conocimiento generado del proyecto del Genoma Humano, ha permitido la identificación de variaciones genéticas comunes involucradas en la etiología de la obesidad y fenotipos asociados. Aunado a esto, a partir del meta-análisis, realizado en el proyecto del Mapa Genético de la Obesidad (Del inglés: *The Human Obesity Gene Map*), se han logrado identificar gran número de loci involucrados en el desarrollo de esta patología. Hasta el 2005, este proyecto reportó 22 genes sustentados con al menos 5 estudios positivos para obesidad, además de otros 105 genes candidatos. De hecho recientemente se ha reportado que esta lista sigue incrementándose y que actualmente ya son más de 30 los genes que han mostrado

una asociación consistente con la etiología de la obesidad. Dentro de éstos se encuentran *LEP*, *LEPR*, *MC4R*, *ISR*, *IL-6*, *TNF-ALFA*, *ADRB2* y *3*, *PPARG*, *FTO*, *INSIG2*, entre muchos otros. De hecho se han detectado loci de susceptibilidad para obesidad en todos los cromosomas, excepto el cromosoma Y. Entre los estudios, que apoyan la existencia de alteraciones genéticas como una de las causas de la obesidad se encuentran los realizados en casos de obesos con mutaciones de un solo gen, en pacientes obesos con trastornos mendelianos, modelos transgénicos en modelos *murinos* y *knock-out*, experimentos de loci de rasgos cuantitativos (QTL por sus siglas en inglés: *Quantitative Trait Loci*) en animales, estudios de asociación de genes candidatos y escaneos amplios del genoma, que vinculan la obesidad a determinados genes a partir de la consideración de diferentes variables fenotípicas tales como; el peso corporal, el IMC, porcentaje de grasa corporal, etc. Dentro de estos genes, se han identificado principalmente los implicados en diferentes rutas metabólicas involucradas en la regulación del equilibrio energético.^[5,6,7]

2.3 Parámetro de medición

El parámetro más utilizado para el diagnóstico de obesidad es el índice de masa corporal (IMC) —el peso en kilogramos dividido por el cuadrado de la talla en metros (Kg/m^2) — éste es un indicador simple de la relación entre el peso y la talla avalado por la OMS para definir el sobrepeso y la obesidad en los adultos. Se ha establecido que el IMC ideal, oscila entre 20 y 24.99 unidades; el sobrepeso como un IMC igual o mayor a 25 y a la obesidad como un IMC igual o mayor a 30, siendo el IMC de la obesidad grado I de 30 a 34.99, el de la obesidad grado II de 35.0 a 39.99, y de la obesidad mórbida grado III cuando existe un IMC superior a 40.0. En niños de 5 a 14 años, la medición del sobrepeso y la obesidad es más compleja, sin embargo en el 2006 la OMS publicó los “Patrones de crecimiento infantil” (Del inglés: *Who Child Growth Standards*), publicación a partir de la cual se establecieron, entre otras variables, los valores de IMC que describen de una manera más adecuada a los menores de cinco años.^[2,8,9]

2.4. Clasificación de la obesidad

Con base en la contribución de los factores genéticos, la obesidad puede ser clasificada en: a) obesidad monogénica, la cual es muy rara, muy grave y generalmente inicia durante la niñez; b) obesidad sindrómica donde la obesidad es una de las manifestaciones clínicas de algún síndrome mendeliano y tiene una incidencia muy baja; y c) obesidad multifactorial, la cual se desarrolla como consecuencia de la interacción de múltiples genes de susceptibilidad cuya expresión está influenciada por factores ambientales, este tipo de obesidad es la más común, puede manifestarse en la infancia o en la adultez y presenta una expresividad muy variable.

2.5 Abordaje de estudio

Actualmente, en la identificación de genes involucrados en el desarrollo de la obesidad, se utilizan fundamentalmente tres enfoques. El primero se basa en el estudio de genes candidatos, en el que se investiga la asociación entre una variante genética y un fenotipo específico. La selección de los genes se realiza con base en su efecto biológico o participación en la etiología de la enfermedad, en el caso particular de la obesidad, se han estudiado aquellos que participan en rutas metabólicas como: a) la regulación de la ingesta mediada por el sistema nervioso central; b) el metabolismo de la glucosa en tejidos blanco que pudieran contribuir a un exceso de acumulación de tejido graso y c) la regulación del gasto energético y el metabolismo del tejido adiposo en general, incluyendo la oxidación lipídica, lipólisis y lipogénesis. Este abordaje se dirige a identificar variaciones genéticas y su asociación con casos y controles no relacionados.

Otro abordaje es el escaneo amplio del genoma (G-WAS, *por sus siglas en inglés: Genome-Wide Scan*), donde se busca detectar regiones cromosómicas asociadas a rasgos cuantitativos (QTL) o fenotipos específicos, mediante el análisis de gran cantidad de polimorfismos por la metodología de microarreglos ya sea en casos y controles o en familias.

Por último, otro enfoque muy utilizado en la identificación de genes se basa en el análisis de los perfiles de expresión genética de los tejidos entre casos y controles donde se puede comparar la variación entre ambos grupos. A diferencia de los enfoques mencionados anteriormente, este enfoque se basa en el análisis del ARN.^[3,4,10]

El abordaje genómico de la obesidad se ha visto favorecido por el desarrollo de tecnología novedosa capaz de analizar a gran escala las variaciones genéticas tales como los polimorfismos de un sólo nucleótido (SNPs por sus siglas en inglés: *single nucleotide polymorphisms*) que causan susceptibilidad a padecer enfermedades. A un locus polimórfico le corresponden, al menos, dos alelos alternativos. Generalmente, se habla de polimorfismo cuando la presencia de la variación genética es común en la población, es estable y nada o poco perjudicial por sí misma. Por convenio se dice que un locus es polimórfico cuando la variabilidad afecta a más de 1% de la población. Los SNPs representan el tipo de polimorfismo más abundante, de tal manera que se presume podrían existir más de 10 millones de SNPs comunes a lo largo del genoma humano.^[11,12]

2.6 Etiología de la obesidad

La obesidad es causada por alteraciones en el balance entre la ingesta calórica y el gasto energético, el cual es regulado por un complejo sistema fisiológico que requiere la integración de varias señales periféricas y una coordinación central en el cerebro. Es aquí donde el hipotálamo funciona como un regulador central de este sistema. Uno de los primeros genes implicados en la obesidad fue el gen *LEP*, el cual codifica para la hormona leptina sintetizada por los adipocitos y que forma parte del complejo mecanismo de señales hormonales que alcanzan el hipotálamo. Esta hormona es secretada, principalmente por el tejido adiposo, por ende sus niveles plasmáticos están altamente correlacionados con el número de adipocitos y el contenido de grasa en un individuo, actúa en los núcleos del hipotálamo y regula el balance energético del cuerpo, a través de su efecto anorexigénico.^[13,14,15,16]

Inicialmente, se pensó que los efectos de la leptina eran sólo a nivel central, sin embargo actualmente se conoce que esta proteína tiene una pleiotropía funcional

diversa y que al igual que otras hormonas, es capaz de estimular una variedad de respuestas fisiológicas en gran variedad de tipos celulares tanto a nivel central como periférico (Fig. 2.1).

A partir del estudio de los procesos fisiológicos donde esta hormona participa, se han logrado elucidar algunos de los mecanismos mediante los cuales ésta regula diversas funciones. La leptina actúa a través de sus receptores transmembranales, los cuales pertenecen a la superfamilia de los receptores de citocinas clase I y existen en varias isoformas, tales como la forma larga, la corta y la soluble (Fig. 2.2). La forma larga se expresa casi exclusivamente en el hipotálamo. Los receptores de leptina carecen de actividad enzimática intrínseca, por lo que sus dominios citosólicos están estrechamente asociados con proteínas tirosincinasas tales como las cinasas Janus (JAK por sus siglas en inglés: *Jak Kinase*).

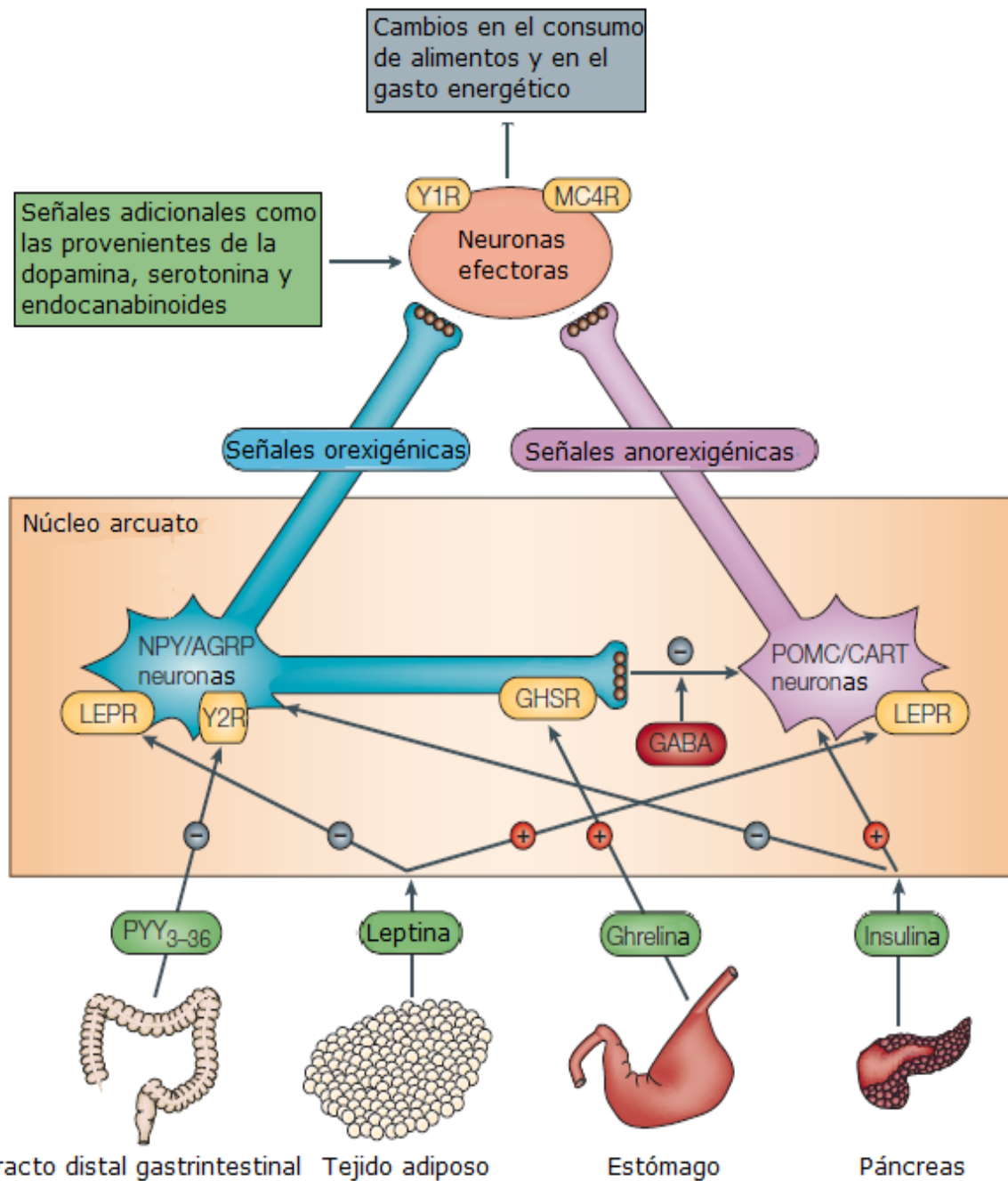


Figura 2.1 Regulación fisiológica del balance de energía. El hipotálamo funciona como un regulador central, éste recibe información acerca del balance a través de señales neuronales y hormonales, las cuales a su vez producen efectos anorexigénicos u orexigénicos en el organismo. Modificada de Bell, 2005.^[14]

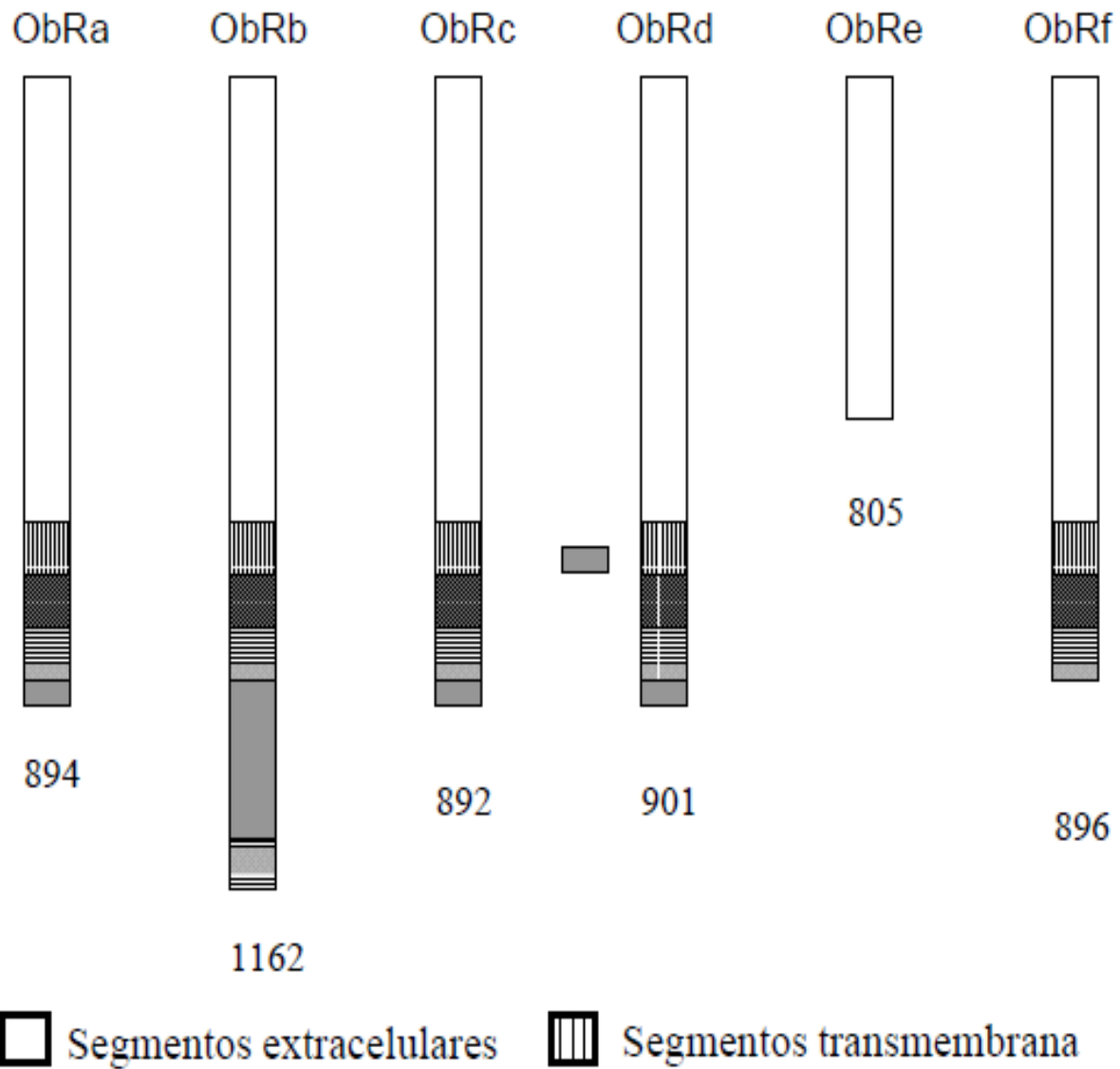


Figura 2.2 Isoformas del receptor de la leptina. Representación esquemática de la estructura general de los subtipos receptores de leptina (ObR, por sus siglas en inglés *Obesity Receptor*). Las regiones de alta homología entre los diversos subtipos están representadas por los mismos símbolos; el número total de residuos de aminoácidos está indicado en la parte inferior del esquema correspondiente a cada subtipo. Modificada de *Sánchez, 2005*.^[17]

2.7 Gen SOCS3 y su relación con la obesidad

Cuando la leptina se une a la isoforma larga del receptor (LEPRb, por sus siglas en inglés *Leptin Receptor b*) (Fig. 2.3), se genera un cambio conformacional que induce a la formación de dímeros del receptor que activan a la cinasa JAK-2, la cual se autofosforila en varios residuos de tirosina, al mismo tiempo que fosforila residuos de tirosina en sitios específicos del receptor. Algunos de estos residuos fosforilados actúan como sitios de fijación de proteínas Transductores de Señales y Activadores de la Transcripción (STAT, por sus siglas en inglés *Signal Transducer and Activator of Transcription*), induciendo una cascada de señalización, donde la proteína STAT-3 presenta mayor afinidad a estos sitios. Cuando STAT-3 está unida al receptor, la tirosina C-terminal de esta proteína es fosforilada por una JAK-2, lo que induce la disociación de STAT-3 del receptor y a su posterior dimerización. Este dímero se transloca al núcleo, donde se une a secuencias promotoras específicas e induce la transcripción de los genes diana de la leptina.^[13,14,15,16,18,19,20]

La transcripción de genes regulados puede ser perjudicial para la célula tanto si se expresan por periodos demasiado prolongados como por tiempos muy cortos. Por esto, las células deben ser capaces de regular una vía de señalización de acuerdo a sus requerimientos. Dos clases de moléculas participan en la regulación de las vías de señalización activadas por los receptores de citocinas; una de ellas actúa en lapsos breves (minutos) y la otra en lapsos más prolongados. Dentro de estas últimas se encuentran las llamadas proteínas SOCS (supresoras de la señalización de citocinas), que como su nombre lo indica, son reguladores negativos de la transducción de señales y pueden inhibir este proceso de dos maneras. 1) Bloqueando la unión de otras proteínas de señalización (por ejemplo los STAT) con el receptor de leptina activado (Fig. 2.3). 2). Todas las proteínas SOCS contienen un dominio denominado Caja SOCS, que les permite reclutar componentes de ligasas de ubiquitina, mediante los cuales se induce la degradación de proteínas interrumpiendo de manera permanente las vías de señalización mediadas por las JAKs (Fig. 2.4.).^[18,19]

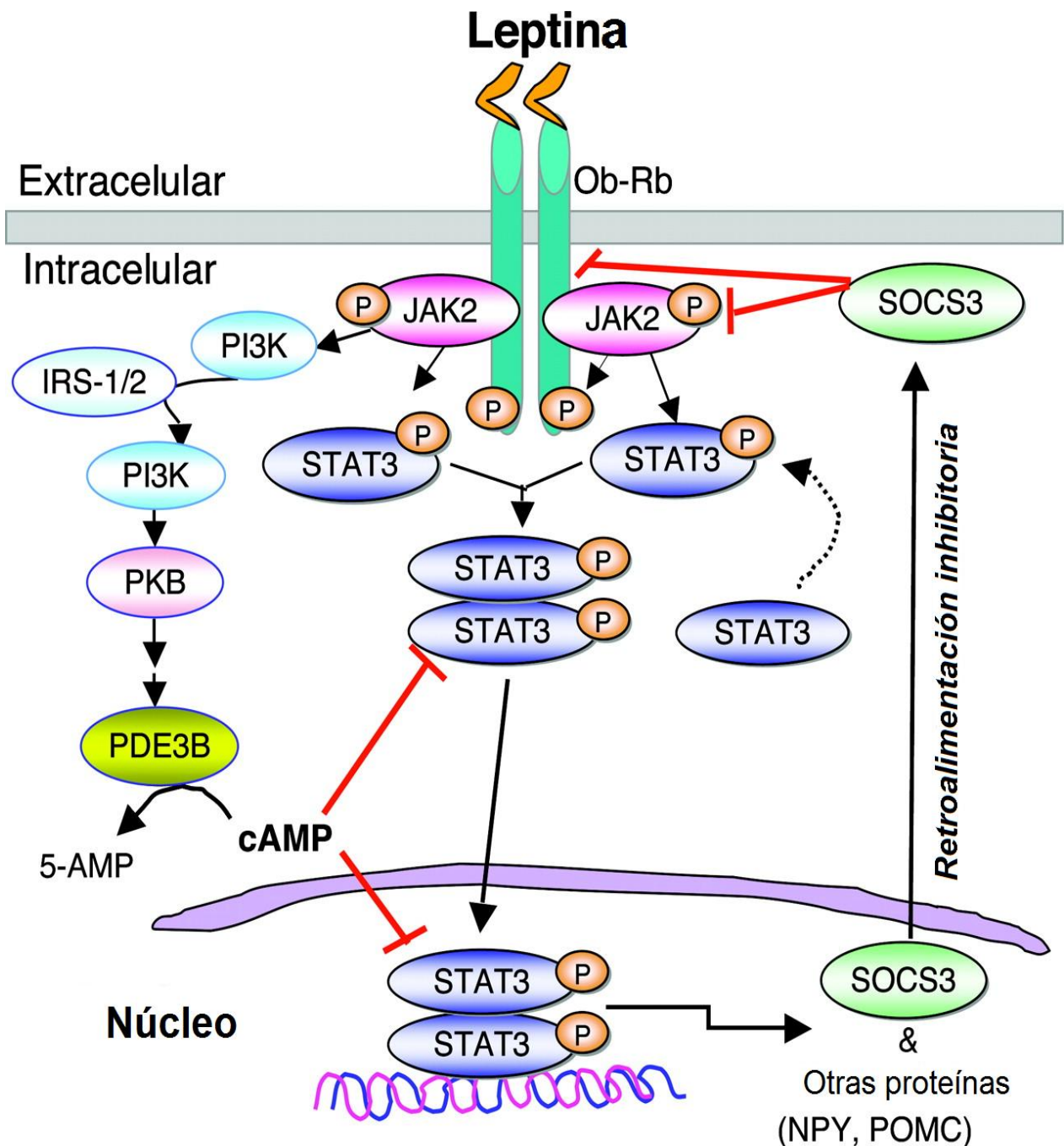
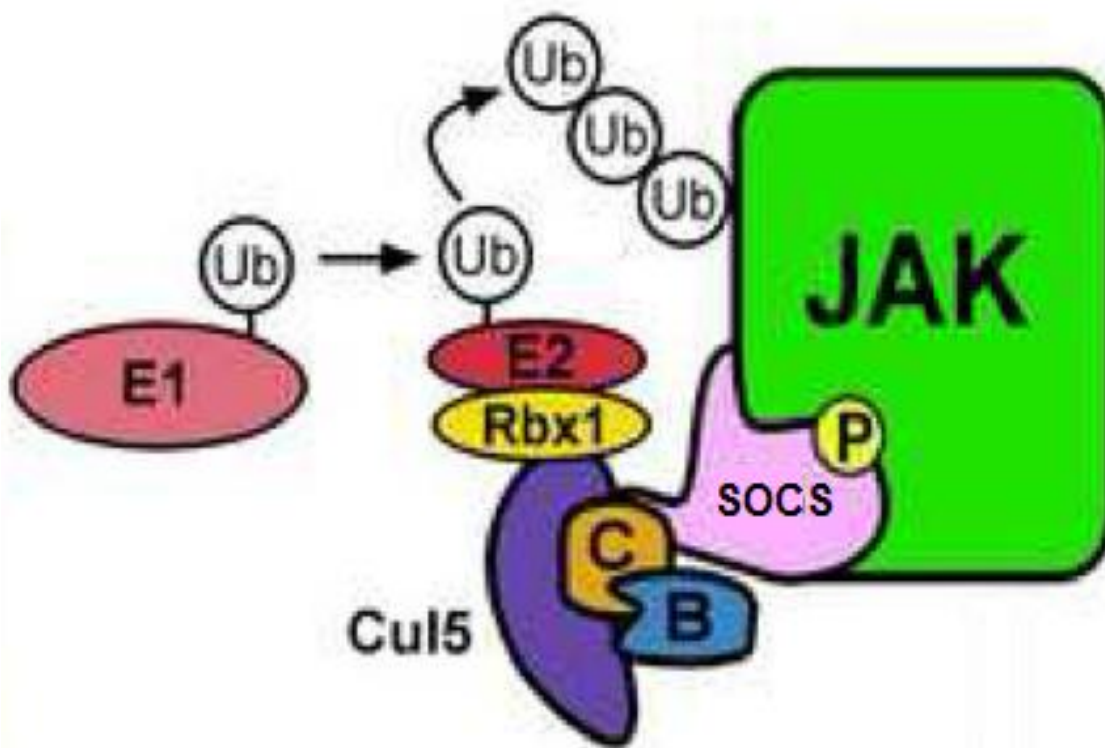


Figura 2.3 Esquema de señalización intracelular de la leptina en el hipotálamo. Una vez unida a su receptor, la leptina genera una cascada de señalización que culmina en la transcripción de genes diana, cuyo efecto a su vez, retroalimenta la cascada. Modificada de *Sahu, 2004*.^[21]



Degradación proteosomal

Figura 2.4. Mecanismo alternativo de regulación de SOCS sobre la vía JAK/STAT. El complejo ubiquitina-ligasa se une a la caja de motivos SOCS, y a su vez ubiquitina las proteínas asociadas, haciéndolas un blanco para su degradación. Modificada de Croker, 2008.^[22]

La relación que *SOCS3* tiene con la obesidad proviene del análisis de diversos estudios, entre ellos, aquellos que sugieren que la vía de señalización mediada por STAT-3 participa en la homeostasis de la energía a través de la ruta de la melanocortina, una de las principales vías involucradas en la regulación de este proceso. Aunado a esto, múltiples artículos resaltan la participación que *SOCS3* podría tener en la resistencia a la leptina, a través de su actividad en la retroalimentación negativa de la vía de señalización JAK/STAT. Una teoría es que la hiperleptinemia que acompaña a la obesidad, incrementa la expresión hipotalámica de *SOCS3*, teniendo como consecuencia un bloqueo constante de la vía de señalización de la leptina y a su vez de su efecto anorexigénico (Fig. 2.5).^[13,19,23,24]

Sin embargo, aún cuando *SOCS3* ha sido un gen ampliamente estudiado para dilucidar los mecanismos involucrados en la etiología de otros padecimientos, su asociación con obesidad ha sido escasamente indagada. De hecho, el Centro Nacional de Información sobre Biotecnología de Estados Unidos, (NCBI, por sus siglas en inglés *National Center for Biotechnology Information*), actualmente no exhibe más de una decena de artículos de los polimorfismos de este gen asociados con obesidad y solo uno de estos estudios fue realizado en población hispanoamericana en pacientes que padecen arterosclerosis y resistencia a la insulina (Cuadro 2.1).

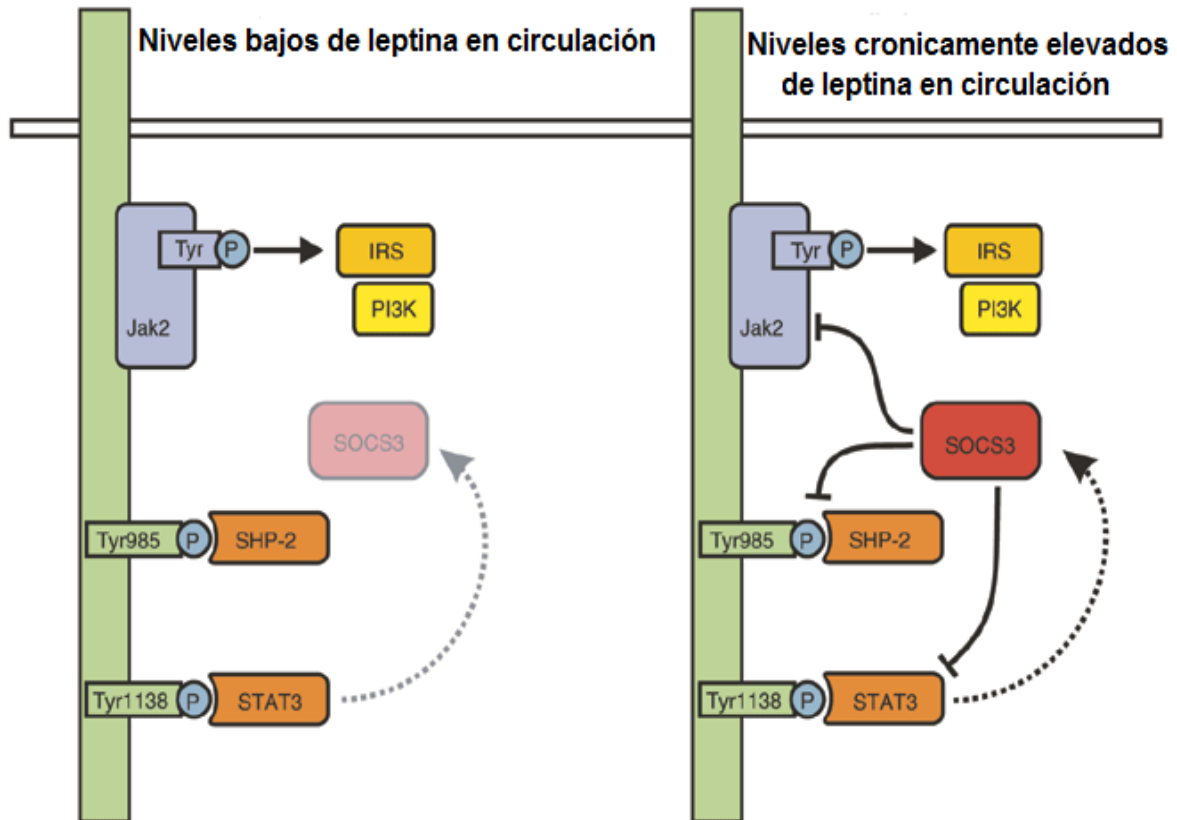


Figura 2.5 Mecanismo propuesto de resistencia a la leptina. La cascada de fosforilaciones iniciada por la unión de leptina a su receptor activa entre otros, al factor de transcripción STAT3, quien entre sus blancos tiene a SOCS3. La proteína SOCS3 por su parte, es capaz de unirse al complejo receptor de leptina-JAK2, atenuando los efectos de este complejo en la célula. De esta manera niveles crónicos de leptina circulante causan una sobreproducción de SOCS3 y por lo tanto un bloqueo constante al efecto anorexigénico de esta hormona. Modificada de Münzberg, 2007. ^[25]

Cuadro 2.1 Estudios de asociación de SNPs del gen *SOCS3*, con obesidad en diversas poblaciones.

Gen	N	Descripción	Asociación	Año de publicación	Referencia
	1425	90 familias hispanoamericanas y afroamericanas con arterosclerosis y resistencia a la insulina de San Antonio, Texas y San Luis Valley, Colorado.	Si	2009	26
SOCS3	2777	Gemelas caucásicas adultas sin obesidad de Reino Unido	No	2006	27
	1443	Población alemana de niños y adolescentes con obesidad extrema.	No	2007	28
	11335	Meta-análisis de un SNP en cuatro diferentes poblaciones de alemanes con DMT2.	No	2008	29

3. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

La obesidad es una enfermedad de origen y desarrollo multifactorial, cuyo aumento tanto en su incidencia como en su prevalencia, así como su influencia en el desarrollo de otras patologías crónico degenerativas, hace impostergable la identificación de los factores que contribuyen a su fisiopatogenia.

Por otro lado, el hecho que en una población, individuos con los mismos patrones de ingesta y gasto energético, presenten variaciones en el peso corporal, apoyan la intervención de factores genéticos en el desarrollo de esta enfermedad.

Sin embargo, en la mayoría de los estudios de genes candidatos realizados en todo el mundo, se han encontrado correlaciones muy débiles y/o de poca reproducibilidad. Lo que sugiere que existe gran heterogeneidad genética entre las poblaciones y apoya la necesidad de hacer estudios dirigidos a poblaciones más homogéneas.^[14]

Siendo la regulación de ingesta de alimentos uno de los mecanismos clave en el desarrollo de la obesidad, se vuelve indispensable investigar de qué manera el componente genético contribuye a la alteración de este proceso. Actualmente, a pesar del papel tan importante que tiene el gen *SOCS3* en la vía de señalización de la leptina, no existen reportes donde se haya analizado la presencia de polimorfismos en este gen en el desarrollo de la obesidad en población mexicana. Por lo anterior, en este proyecto se investiga si SNPs localizados en el gen *SOCS3*, se asocian a la susceptibilidad a presentar obesidad en pacientes mexicanos.

4. OBJETIVOS

4.1 Objetivo General

Determinar si polimorfismos localizados en el gen *SOCS3*, involucrado en la regulación de la ingesta, se asocian a la susceptibilidad a presentar obesidad en población mexicana.

4.2 Objetivos Particulares

- Determinar si polimorfismos localizados en el gen *SOCS3* se asocian al riesgo a desarrollar obesidad en nuestra población.
- Establecer la frecuencia alélica y genotípica de los polimorfismos analizados en población mexicana.
- Estimar si existe correlación entre los SNPs analizados y la gravedad de la enfermedad.
- Determinar si existen diferencias entre las frecuencias de los SNPs analizados en esta tesis con respecto a las de otras poblaciones.

5. HIPÓTESIS DE INVESTIGACIÓN

Existe asociación entre polimorfismos localizados en el gen SOCS3 y la susceptibilidad a desarrollar obesidad en pacientes mexicanos.

Existe correlación entre los polimorfismos identificados en el gen SOCS3 y la gravedad de la enfermedad.

6. DISEÑO EXPERIMENTAL

6.1 Tipo de estudio

Este es un estudio de carácter observacional porque no se realiza ninguna intervención sobre el factor de estudio, transversal porque solo se analiza la prevalencia de la enfermedad en un periodo determinado, de casos y controles porque la enfermedad ya está presente; comparativo por la presencia de grupo control, prolectivo por el recabado de información, y retrospectivo por la direccionalidad de la asociación.

6.2 Población de estudio

Pacientes adultos mexicanos atendidos en el Hospital Regional 1º de Octubre, Hospital Regional Lic. “Adolfo López Mateos” y en la Clínica de Detección y Diagnóstico Autorizado del Instituto de Seguridad y Servicios Sociales de los Trabajadores del Estado, ISSSTE.

6.3 Diseño y tamaño de la muestra

Se realizó un muestreo no probabilístico por conveniencia.

En una población de 600 casos, cada paciente fue evaluado por un médico endocrinólogo o internista, quienes una vez obtenido el consentimiento informado de los participantes, llenaron la hoja de captación de datos que contiene información demográfica de los pacientes (edad, sexo, origen geográfico, v. anexo 1), antecedentes familiares y pruebas de laboratorio (glucosa, colesterol y triglicéridos). Como controles se incluyeron 378 individuos no obesos mayores de 30 años, de quienes se obtuvieron los mismos datos.

6.4 Criterios de inclusión, exclusión y eliminación

Criterios de inclusión. Se incluyeron pacientes mexicanos mayores de 18 años con diagnóstico clínico de obesidad realizado con base al IMC según los parámetros de OMS, de esta manera fueron clasificados como: obesidad grado I cuando el IMC se

encontraba entre 30 y 34.9, obesidad grado II cuando era de 35.0 a 39.9 y obesidad mórbida grado III aquellos que presentaron un IMC a partir de 40.

Para el grupo control se seleccionaron individuos mayores de 30 años con un índice de masa corporal <25 de acuerdo con los criterios establecidos por la OMS; que el peso fuera igual o estuviera entre un intervalo no mayor a ± 5 kg al alcanzado después de la adolescencia (18 años) y que no refirieran antecedentes personales de enfermedades crónicas. Tanto los casos como los controles, fueron captados en la Ciudad de México, tanto sus padres como sus abuelos nacidos en México o al menos tres abuelos de origen mexicano pudiendo ser el cuarto abuelo de origen español.

Criterios de exclusión. Se excluyeron a todos aquellos casos de obesidad causada por disfunción endocrinológica, síndromes genéticos, síndrome metabólico o secundaria a tratamiento farmacológico. Fueron excluidos los pacientes trasfundidos en los últimos tres meses.

Criterios de eliminación. Se eliminaron del proceso de genotipificación todas aquellas muestras que en alguno de los pasos de la metodología presentaron contaminación microbiológica o cuyo volumen y/o concentración no fue suficiente para alcanzar la concentración mínima requerida para su medición por el método de TAQMAN®.

6.5 Variables

Cuadro 6.1 Definición de variables

Variable	Definición	Categorías/Nivel de medición
Edad	Número de años cumplidos al momento de la entrevista.	Variable numérica discreta
Género	La totalidad de las características de la estructura reproductiva, funciones, fenotipo y genotipo que diferencian a los individuos en masculinos y femeninos.	Variable cualitativa dicotómica 1. Femenino 2. Masculino
Índice de Masa Corporal (IMC)	Indicador de la densidad corporal definido por: Peso corporal de la persona en kilogramos dividido entre el cuadrado de su talla en metros (kg/m^2).	Variable numérica continua
Polimorfismo rs7221341	Polimorfismo del gen SOCS3 localizado en Chr17: 73843066* Homocigoto o heterocigoto según los alelos C/T*	Variable ordinal 1. Homocigoto alelo mayor (CC)* 2. Heterocigoto (CT)* 3. Homocigoto alelo menor (TT)*
Polimorfismo rs2280148	Polimorfismo del gen SOCS3 localizado en Chr17: 73865975* Homocigoto o heterocigoto según los alelos A/C*	Variable ordinal 1. Homocigoto alelo mayor (AA)* 2. Heterocigoto (AC)* 3. Homocigoto alelo menor (CC)*
Polimorfismo rs4969168	Polimorfismo del gen SOCS3 localizado en Chr17: 73865388* Homocigoto o heterocigoto según los alelos A/G*	Variable ordinal 1. Homocigoto alelo mayor (AA)* 2. Heterocigoto (AG)* 3. Homocigoto alelo menor (GG)*
Polimorfismo rs9914220	Polimorfismo del gen SOCS3 localizado en Chr17: 73874485* Homocigoto o heterocigoto según los alelos C/T*	Variable ordinal 1. Homocigoto alelo mayor (CC)* 2. Heterocigoto (CT)* 3. Homocigoto alelo menor (TT)*

* [26, 30]

6.6 Técnicas

6.6.1 Estrategia general

CONSIDERACIONES ÉTICAS. El riesgo para los participantes en este estudio fue mínimo ya que sólo se requirió una punción venosa para la toma de sangre, la cual fue realizada por personal capacitado para este procedimiento. Todo paciente fue evaluado por médicos especializados como un endocrinólogo o internista, un genetista y un nutriólogo, quienes les informaron sobre los objetivos del estudio y después de haber aceptado participar voluntariamente en el mismo, firmaron el consentimiento informado y llenaron la hoja de captación de datos. Las mismas consultas y procedimientos se realizaron para los controles. La información de cada participante fue resguardada por los investigadores responsables del proyecto en el INMEGEN, M. en C. Yolanda Saldaña y la Dra. Lorena Orozco a fin de garantizar la privacidad y confidencialidad de los participantes.

CONSIDERACIONES DE BIOSEGURIDAD. La toma de muestras de sangre fue realizada en las instalaciones del ISSSTE por el personal capacitado en la atención del paciente por la técnica estándar de venopunción; la muestra fue guardada de 4-8°C hasta su traslado al INMEGEN. El transporte de las muestras fue realizado por personal del INMEGEN en equipo termo sellado con distintivos de contener material biológico y con protección para asegurar su llegada al instituto sin daños. En el laboratorio el manejo de las muestras fue realizado con base en los procedimientos establecidos por la comisión de bioseguridad de Instituto.

EXTRACCIÓN DE ADN. Tanto a casos como controles se les extrajo ADN genómico a partir de la lisis de leucocitos de sangre periférica, con lo cual se constituyó el banco de ADN. El análisis molecular del gen *SOCS3* se describe a continuación.

SELECCIÓN DE POLIMORFISMOS: De acuerdo a lo reportado en la literatura se escogieron algunos de los loci polimórficos estudiados consistentemente en otras poblaciones con obesidad o fenotipos asociados. La localización de dichos SNPs se describe de manera general en la figura 6.1.

GENOTIPIFICACIÓN DE POLIMORFISMOS. A todas las muestras se les realizó Reacción en Cadena de la Polimerasa (*PCR*, por sus siglas en inglés: Polymerase Chain Reaction), para poder detectar la presencia de polimorfismos a través de la hibridación del ADN con las sondas diseñadas para cada una de las variantes (Cuadro 6.2). Posterior a la amplificación se realizó la discriminación alélica por medio del software SDS versión 2.2 de Applied Biosystems®. La fluorescencia emitida permitió la clasificación del genotipo de cada muestra.

Con base en los datos generados se determinó, presencia, frecuencia, prevalencia y asociación de los polimorfismos con la gravedad de la obesidad, según el género y la edad, además se realizó la comparación con otras poblaciones determinándose así las similitudes y diferencias que pueden ser claves para la enfrentar este padecimiento.

En la figura 6.2 se presenta el algoritmo metodológico utilizado para este estudio.

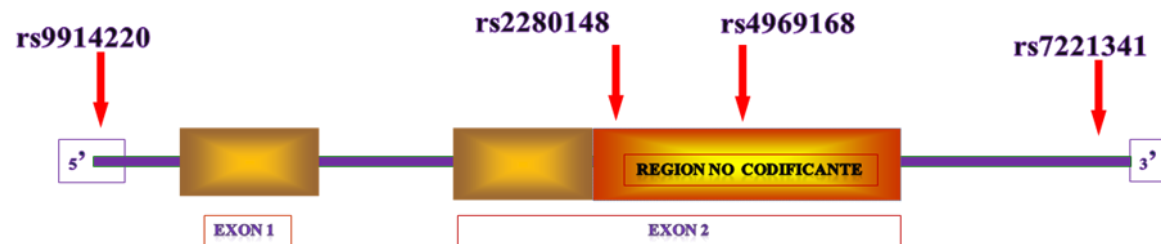


Figura 6.1 Gen *SOCS3* y ubicación de los polimorfismos de un solo nucleótido analizados en este estudio. El gen *SOCS3* consta de dos exones. Los SNPs rs2280148 y rs4969168 se encuentran en la región no codificante del exón 2 del gen *SOCS3*. El polimorfismo rs9914220, por su parte se ubica en la región 5' del gen mientras que el polimorfismo rs7221341 es localizado en la región 3' UTR.

Cuadro 6.2 Secuencia de las sondas utilizadas en la identificación de polimorfismos en el gen SOCS3.^[31]

Sonda (rs)	Secuencia	Polimorfismo	Dirección
rs9914220	CACCCCTGGTATGCACTGTGCCGTG[C/T]ACTGATTCTTGGGCAAGTTCAAATA	C/T	Forward
rs2280148	CAGAGGGAGGGGCCTGTCCGCCCTC[G/T]TTCCCCCAGAGCTACAGGACTCTC	A/C	Reverse
rs4969168	AGGAGACCAGCTGACCAGCCCATCC[A/G]TCCCCTCAAATGTTGCTTCCCCCT	A/G	Forward
rs7221341	GTTAATAGCACCCCAGCCCCTCCCA[C/T]CAGGCTCAAGGGGCTCTTTTGCCTT	C/T	Forward

Diagnóstico clínico para casos y controles con base en el IMC.

Creación del banco de ADN.

Selección de polimorfismos de un solo nucleótido en el gen *SOCS3*.

Genotipificación de SNPs por TaqMan.

Análisis de datos y Discusión de Resultados.

Figura 6.2. Diagrama de flujo (Algoritmo metodológico).

6.6.2. Estudio molecular

I. Extracción de ADN

La extracción de ADN se realizó a partir de leucocitos totales utilizando el Kit QIAGEN®.

Se obtuvieron 10 mL de sangre periférica en tubos Vacutainer® con EDTA. Se centrifugó la muestra de sangre total a 3000 rpm. La capa de leucocitos fue separada colocándose en un tubo falcón de 15 mL. A ésta se le realizaron lavados con RCLB (por sus siglas en inglés: *Red Cell Lysis Buffer*), centrifugándose entre cada lavado de 2500 a 3000 rpm, hasta conseguir el botón color blanquecino. A dicho botón se le agregó RCLB y se agitó en vortex hasta resuspender totalmente. Se agregó WCLB (por sus siglas en inglés: *White Cell Lysis Buffer*) y se agitó vigorosamente en vortex. Se agregó precipitador de proteínas y se centrifugó a 3500 rpm. El sobrenadante se transfirió a otro tubo falcón al que se le agregó isopropanol y se agitó hasta obtener la precipitación de ADN. Se centrifugó a 3000 rpm, se decantó para realizar el lavado del ADN con alcohol al 70%, una vez evaporado el remanente se resuspendió en solución hidratante, manteniéndose a 4 °C hasta su posterior uso. Para verificar la integridad del ADN, se preparó un gel del agarosa al 1% teñido con bromuro de etidio. El gel se sometió a electroforesis a 100 volts por 20 min, y se visualizó en un transluminador con luz ultravioleta.

II. Ajuste de concentración

La medición de ADN se llevó a cabo en un espectrofotómetro (NanoDrop® ND-1000 Spectrophotometer) ajustándose a cero con la solución blanco. Se midió la concentración de cada muestra por duplicado, obteniéndose así un promedio del volumen de ADN necesario para obtener la concentración requerida con base en la siguiente fórmula:

$$V_1=(C_2 \times V_2)/C_1$$

Donde:

V_1 : Volumen de ADN requerido.

C_1 : Promedio de las concentraciones de ADN iniciales.

C_2 : Concentración deseada.

V_2 : Volumen deseado.

y la cantidad de agua necesaria se obtiene por diferencia:

$$V_{\text{agua}} = V_2 - V_1$$

Una vez agregadas las cantidades requeridas, se midió la concentración de la mezcla ADN/agua por duplicado. Cuando fueron requeridos ajustes se utilizaron las mismas fórmulas sustituyendo las últimas concentraciones obtenidas. Las diluciones de cada muestra se depositaron en cada uno de los 96 pocitos de las placas para amplificación por PCR. El orden de las muestras fue preestablecido. Se dejó secar la placa a temperatura ambiente de 48 a 72 hs.

III. Reacción en cadena de la polimerasa

Se preparó la Solución de Reacción a partir de los siguientes reactivos en sus correspondientes fracciones:

TAQMAN® Universal PCR Master Mix / 0.5

Sonda / 0.0125

Agua / 0.4875

Una vez homogeneizada, se agregaron 5 μ L de Solución de Reacción, a cada uno de los 96 pocitos de la placa con muestras. La placa se selló y se centrifugó a 3000 rpm / 2 min. Se inició la reacción en termociclador (GeneAmp® PCR System 9700) con las siguientes condiciones:

Temperatura de preparación: 95 °C / 10 min

Temperatura de Desnaturalización: 95°C / 15 seg

Temperatura de Hibridación: 60 °C / 1 min

Temperatura de enfriamiento: 4 °C ∞

Una vez terminado este proceso se centrifugó la placa a 3000 rpm / 2 min. Para su posterior medición de emisión de fluorescencia.

IV. Genotipificación de muestras por discriminación alélica.

Una vez realizado el proceso de amplificación® (Fig. 6.3), se procedió a la discriminación alélica en el equipo (ABI 7900 HT Fast Real Time PCR System) a través del programa SDS Versión 2.2 de Applied Biosystems, en el cual se creó un archivo de la discriminación alélica para la placa de 96 pozos, se nombraron los marcadores que según su fluorescencia se posicionaron en un gráfico en el eje “x” (VIC), “y” (FAM) o entre ambos, determinando así el genotipo homocigoto o heterocigoto de cada muestra (Fig. 6.4, anexo 2). Es importante recalcar que el proveedor (Applied Biosystems®) nos proporciona los datos acerca del genotipo correspondiente a cada marcador (VIC ó FAM) por medio de la secuencia de cada sonda solicitada (Cuadro 6.2).

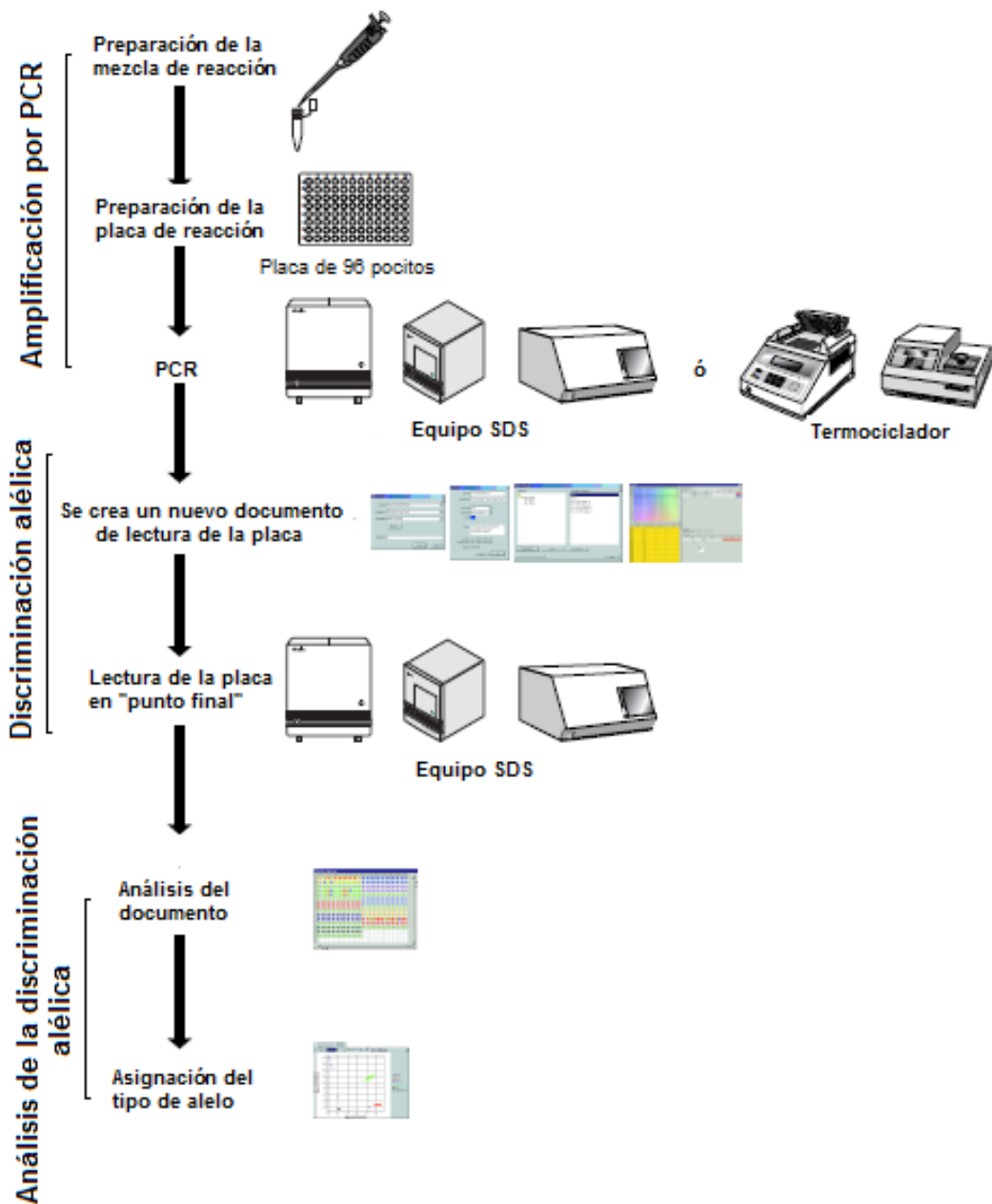


Figura 6.3. Esquema general de genotipificación del ADN. Una vez extraído el ADN se efectúa la Reacción en Cadena de la Polimerasa que es la amplificación exponencial de ADN, suficiente para una emisión de fluorescencia que permita la discriminación alélica. Posterior a ello se asignan los alelos en el total de las muestras para su posterior análisis.^[32]

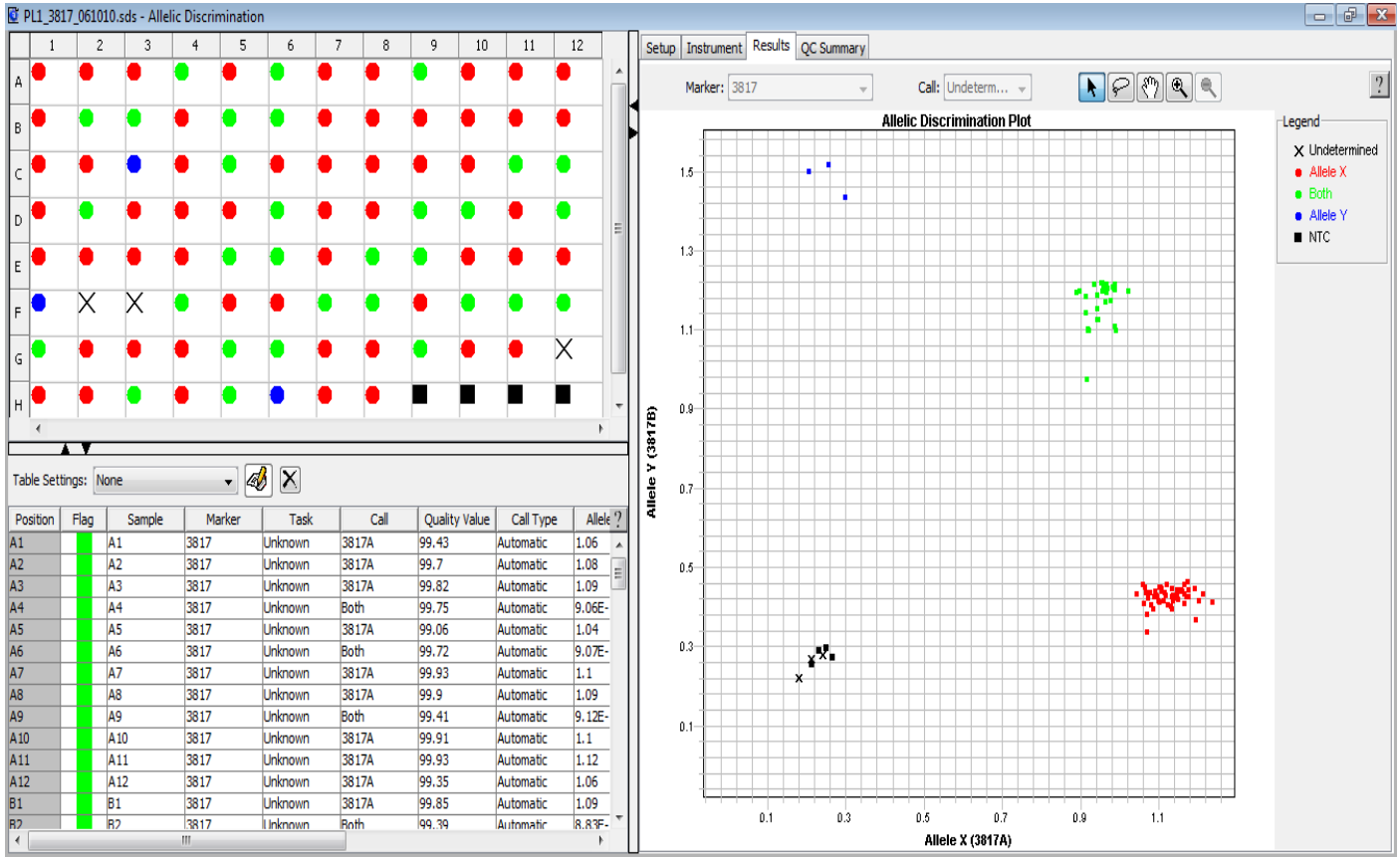


Figura 6.4. Plot de discriminación alélica generado por el software SDS 2.2 ®. La fluorescencia emitida después de la PCR, que resulta de la agrupación de las muestras con base en el genotipo se observa en un gráfico. Esta agrupación depende esencialmente de la presencia del polimorfismo de un solo nucleótido, que determina la emisión de fluorescencia de cualquiera de ambos marcadores (VIC o FAM). (Anexo 2).

6.7 Diseño estadístico

Se realizó estadística descriptiva de las variables en casos y controles. Las frecuencias de los SNPs analizados en una muestra de individuos mexicanos con y sin obesidad fueron reportadas en porcentaje. La asociación se determinó mediante las pruebas ji cuadrada y exacta de Fisher, el equilibrio de Hardy Weinberg se evaluó con el programa FINETTI versión 3.0.5 (Fig 6.5).

Para determinar si estos polimorfismos contribuyen de manera independiente o como haplotipos a la presencia y a la gravedad de la obesidad se utilizó el programa HAPLOVIEW (Fig. 7.4).

El riesgo fue estimado por razón de momios con intervalos de confianza del 95% a través del programa EPI INFO. En cada prueba de hipótesis se consideró como significativo un valor de $p < 0.05$ a dos colas.

SNP	Tests for deviation from Hardy-Weinberg equilibrium		Tests for association (C.I.: 95% confidence interval)				
	Controls	Cases	allele freq. difference	heterozygous	homozygous	allele positivity	Armitage's trend test
75430F	n11=152 (148.67) n12=46 (52.67) n22=8 (4.67) f_a1=0.85 +/-0.019 F=0.12664 p=0.069130 (Pearson) p=0.087673 (Lr) p=0.094950 (Exact)	n11=262 (265.35) n12=95 (88.31) n22=4 (7.35) f_a1=0.86 +/-0.013 F=-0.07580 p=0.149792 (Pearson) p=0.123890 (Lr) p=0.196762 (Exact)	Risk allele 2				
			[1]<->[2]	[11]<->[12]	[11+]<->[22]	[11]<->[12+22]	common odds ratio
			Odds_ratio=0.939 C.I.=[0.668-1.321] chi2=0.13 p=0.71924 (P)	Odds_ratio=1.198 C.I.=[0.799-1.796] chi2=0.77 p=0.38114	Odds_ratio=0.290 C.I.=[0.086-0.979] chi2=4.46 p=0.03468	Odds_ratio=1.064 C.I.=[0.722-1.566] chi2=0.10 p=0.75485	Odds_ratio=0.883 chi2=0.13 p=0.71923
			Risk allele 1				
			[2]<->[1]	[22]<->[12]	[22]<->[11]	[11+12]<->[22]	common odds ratio
			Odds_ratio=1.065 C.I.=[0.757-1.498] chi2=0.13 p=0.71924 (P)	Odds_ratio=4.130 C.I.=[1.182-14.428] chi2=5.61 p=0.01784	Odds_ratio=3.447 C.I.=[1.021-11.639] chi2=4.46 p=0.03468	Odds_ratio=3.606 C.I.=[1.072-12.126] chi2=4.88 p=0.02722	Odds_ratio=1.226 chi2=0.13 p=0.71923

Figura 6.5. Software Finetti para evaluación del Equilibrio de Hardy Weinberg. Este software aporta valores de: Oportunidad Relativa, intervalo de confianza, ji cuadrada y significancia, para cada uno de los alelos presentes. Tomada de [33].

7. RESULTADOS

7.1 Características fenotípicas de la población

La población de estudio analizada en esta tesis fue de 600 pacientes mayores de 18 años con diagnóstico clínico de obesidad ($IMC > 30 \text{ kg/m}^2$) y 378 controles mayores de 30 años, (IMC entre 20 y 25 kg/m^2).

En relación a esto se observó que el número de controles es menor que el de los pacientes con obesidad, lo cual es un reflejo de la situación epidemiológica de esta entidad en nuestra población. Por otro lado, observamos que las muestras provenientes de mujeres predominan tanto en controles como en los casos (Cuadro 7.1). De hecho de estas últimas casi dos tercios de las muestras recolectadas son de mujeres (Fig. 7.1).

Por otra parte, dentro de los casos se encontró mayor prevalencia de obesidad tipo I ($30\text{-}34.99 \text{ kg/m}^2$), seguida de la tipo II ($35\text{-}39.99 \text{ kg/m}^2$) y finalmente la tipo III ($\geq 40 \text{ kg/m}^2$). Al estratificar por género, en mujeres sobresalió la obesidad grado II y grado III, (6.84 y 13.84 puntos porcentuales, respectivamente, por encima de la presentada en hombres). En población masculina se observó una proporción mayor de varones con obesidad tipo I que en mujeres (68.78 % vs 48.1%), (Cuadro 7.2 y Figura 7.2). Cabe señalar que este patrón de comportamiento fue muy similar al observado en la ENSANUT 2006 (Cuadro 7.3).

Cuadro 7.1 Porcentaje de casos y controles estratificados por sexo analizados en el estudio.

	TOTAL (%)	HOMBRES (%)	MUJERES (%)
CONTROLES	378 (38.65)	148 (39.15)	230 (60.85)
CASOS	600 (61.35)	205 (34.17)	395 (65.83)
TOTAL	978 (100)	353 (36.1)	625 (63.9)

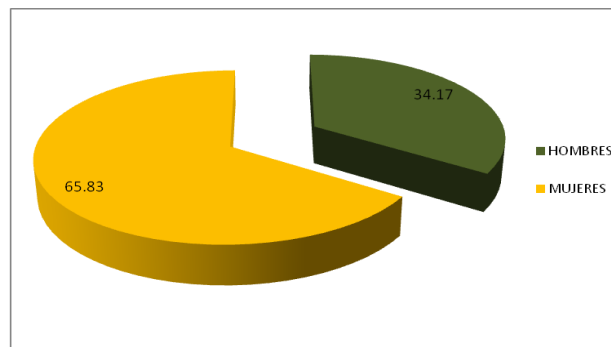


Figura 7.1. Porcentaje de hombres y mujeres casos analizados en el estudio.

Cuadro 7.2 Prevalencia de obesidad en hombres y mujeres estratificada por gravedad.

	OB I	OB II	OBIII	TOTAL CASOS
HOMBRES (%)	141 (68.78)	41 (20)	23 (11.22)	205
MUJERES (%)	190 (48.10)	106 (26.84)	99 (25.06)	395
TOTAL	331 (55.17)	147 (24.5)	122 (20.33)	600

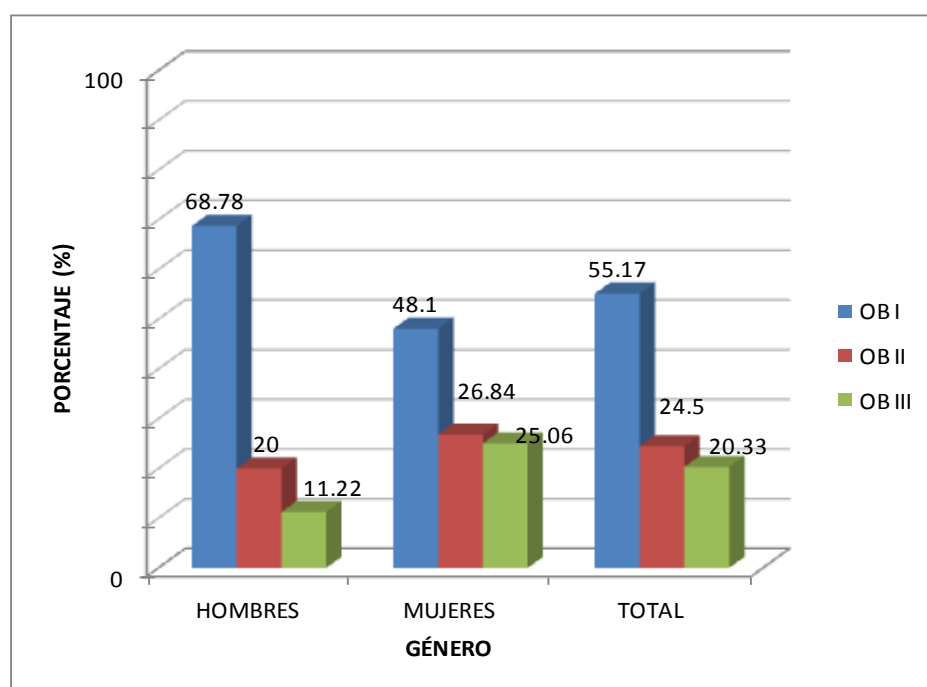


Figura 7.2. Porcentaje de los diversos grados de obesidad en hombres y mujeres

Cuadro 7.3 Analogía de los resultados arrojados en esta tesis contra los presentados por ENSANUT 2006. ^[34]

“Asociación de polimorfismos en el gen SOCS3 con el riesgo a padecer obesidad en pacientes mexicanos”				
			ENSANUT 2006	
LUGAR	Ciudad de México		Encuesta Nacional*	
TIPO DE POBLACIÓN	Adultos definidos a partir de su IMC como casos de obesidad o controles.		Población abierta **	
EDAD	Hombres 44 ± 9.9	Mujeres 46 ± 9.8	Todas las edades***	
NORMOPESO (%)	Hombres 39.15	Mujeres 60.85	Hombres 16.1	Mujeres 16.3
OBESIDAD (%)	Hombres 34.17	Mujeres 65.83	Hombres 27.1	Mujeres 48.4

* La comparación se hizo únicamente con los del Distrito Federal.

** La comparación se hizo únicamente con los adultos en peso adecuado y con obesidad.

*** La comparación se hizo únicamente con los del intervalo de edades del 40 a 49 años.

La edad promedio de los controles tanto masculinos como femeninos se encuentra en la cuarta década de vida, (Cuadro 7.4). Interesantemente, se observó que la obesidad más grave se presentó en los varones más jóvenes mientras que en las mujeres se observó lo contrario, ésta se presentó en mujeres con mayor edad.

Por otra parte, al comparar el grado de obesidad (IMC) entre ambos géneros, se observó que esta variable es ligeramente mayor en las mujeres que en los varones.

Cuadro 7.4. Edad promedio prevalente en controles y casos estratificados por gravedad.

	EDAD PROMEDIO ± D.E.			
	CONTROLES	OB I	OB II	OB III
HOMBRES	42 ± 8.94	45 ± 9.66	43 ± 10.99	42 ± 8.94
MUJERES	40 ± 8.30	45 ± 9.36	45 ± 10.23	47 ± 10.17

7.2 Características genotípicas de la población

En este estudio se analizaron 4 SNPs (rs7221341, rs4969168, rs2280148 y rs9914220) que en otras poblaciones han mostrado asociación con obesidad o con fenotipos relacionados.

De los polimorfismos incluidos en este estudio la variante rs2280148, no se analizó en nuestra población de estudio ya que no fue informativa a diferencia de lo reportado en poblaciones hispanoamericana y afroamericana (Cuadro 2.1).

Por otro lado, la distribución de los genotipos de los polimorfismos analizados, rs7221341, rs4969168 y rs9914220 se observaron en Equilibrio de Hardy Weinberg (E-HW). Para los SNPs rs7221341 (C/T) y rs9914220 (C/T), los alelos ancestrales fueron los mismos que los reportados para otras poblaciones exceptuando el de la variante rs4969168 (G/A), en la que el alelo de frecuencia menor (A) presentado en la muestra, se encuentra reportado como el ancestral^[35]. La prevalencia del alelo de frecuencia menor de estos polimorfismos es muy similar a poblaciones europeas, pero dista de las poblaciones Orientales, tales como la china y la japonesa, y en casos como el del SNP rs4969168 el alelo de frecuencia menor pasa a ser el de mayor frecuencia en población keniana. Particularmente, para los SNPs rs4969168 (G/A) y el rs9914220 (C/T), encontramos que al igual que lo reportado en población residente en Los Ángeles con ascendencia mexicana, los alelos G y el C, respectivamente, son los más frecuentes, y sus frecuencias son similares a las de población Gujarati de Houston, Texas y la de la Toscana en Italia (Cuadros 7.5 y 7.6).

Cuadro 7.5. Frecuencia genotípica de los polimorfismos rs7221341, rs4969168 y rs9914220, presentada en casos y controles.

SNP	GENOTIPO	FRECUENCIA	
		CONTROLES n (%)	CASOS n (%)
rs7221341	CC	233 (67.15)	372 (67.51)
	CT	104 (29.97)	167 (30.31)
	TT	10 (2.88)	12 (2.18)
rs4969168	GG	218 (63.37)	318 (59.77)
	GA	110 (31.98)	182 (34.21)
	AA	16 (4.65)	32 (6.02)
rs9914220	CC	254 (74.27)	406 (73.82)
	CT	74 (21.64)	135 (24.55)
	TT	14 (4.09)	9 (1.64)

Cuadro 7.6 Analogía entre las frecuencias alélicas menores de la población incluida en este estudio y las de otras poblaciones ^[30].

SNP	POBLACIÓN	ALELO	MAF
rs7221341 (C/T)	Mexicana (controles/casos)	T	0.178 / 0.173
	Mexico-americana	T	0.273
	Gujarati en Houston, Texas	T	0.257
	Toscana, Italia	T	0.425
	Euro-americana	T	0.372
	China	T	0.022
	Japonesa	T	0.013
rs4969168 (G/A)	Mexicana (controles/casos)	A	0.206 / 0.231
	Mexico-americana	A	0.25
	Gujarati en Houston, Texas	A	0.213
	Toscana, Italia	A	0.211
	Euro-americana	A	0.142
	China	A	0.453
	Japonesa	A	0.429
rs9914220 (C/T)	Mexicana (controles/casos)	T	0.149 / 0.139
	Mexico-americana	T	0.129
	Gujarati en Houston, Texas	T	0.173
	Toscana, Italia	T	0.098
	Euro-americana	T	0.053
	China	T	0.412
	Japonesa	T	0.305

Al comparar las frecuencias alélicas y genotípicas entre la totalidad de los casos y controles, no se observaron diferencias estadísticamente significativas para ninguna de las tres variantes rs7221341 (C/T), rs4969168 (G/A) y rs9914220 (C/T) (Cuadro 7.7).

Sin embargo, al estratificar por gravedad y género, se documentó asociación a obesidad dependiente de género en equilibrio de Hardy Weinberg. El genotipo rs4969168A en estado homocigoto presenta asociación ($p= 0.04218$) a riesgo a obesidad grado II en varones. Mientras que el genotipo rs9914220T en estado homocigoto confiere protección ($OR= 0.290$) para obesidad al género femenino (Cuadro 7.8).

Más concretamente los cuadros 7.9 y 7.10 nos muestran la frecuencia genotípica y alélica con que estos polimorfismos se presentan en nuestra población de estudio.

La variante rs7221341, no mostró asociación con obesidad ni como alelo ni como genotipo.

Cuadro 7.7 Frecuencia alélica menor para cada polimorfismo en estudio.

GRAVEDAD	rs7221341 (C/T)		rs4969168 (G/A)		rs9914220 (C/T)	
	OR (95%IC)	p	OR (95%IC)	p	OR (95%IC)	p
OB TOTAL	0.752 (0.320- 1.767)	0.51149	1.371 (0.734-2.560)	0.32025	0.402 (0.172-0.943)	0.03068

Cuadro 7.8 Asociación entre polimorfismos del gen SOCS3 y pacientes estratificados por gravedad y género.

GRAVEDAD	rs7221341 (C/T)		rs4969168 (G/A)		rs9914220 (C/T)	
	OR (95%IC)	p	OR (95%IC)	p	OR (95%IC)	p
OB TOTAL						
Femenino	0.477 (0.157-1.446)	0.18159	1.147 (0.549-2.398)	0.71540	0.290 (0.086-0.979)	0.03468
Masculino	1.541 (0.376-6.323)	0.54549	1.978 (0.601-6.514)	0.25406	0.590 (0.175-1.987)	0.38979
OBI						
Femenino	0.685 (0.196-2.397)	0.55145	1.109 (0.470-2.615)	0.81354	0.304 (0.063-1.458)	0.11604
Masculino	0.783 (0.128-4.805)	0.79142	1.440 (0.374-5.548)	0.59457	0.673 (0.184-2.457)	0.54699
OBI I						
Femenino	0.584 (0.118-2.887)	0.50484	0.814 (0.251-2.641)	0.73154	0.279 (0.034-2.278)	0.20452
Masculino	3.615 (0.689-18.980)	0.10761	4.136 (0.959-17.847)	0.04218	0.654 (0.075-5.672)	0.69790
OBI II						
Femenino	0.140 (0.008-2.485)	0.07045	1.611 (0.598-4.340)	0.34265	0.275 (0.034-2.245)	0.19869
Masculino	0.511 (0.050-5.219)	0.56421	1.625 (0.169-15.610)	0.67127	0.451 (0.024-8.360)	0.31924

Cuadro 7.9 Asociación alélica y genotípica el SNP rs4969168 (G/A) del gen SOCS3 en pacientes masculinos con obesidad II y controles.

GENOTIPO	CASOS N=36 n(%)	CONTROLES N=134 n(%)		OR (95% IC)	χ^2	p
GG	22 (61.11)	91 (67.91)				
GA	10 (27.78)	39 (29.10)	GG vs GA	1.061 (0.460-2.448)	0.02	0.89032
AA	4 (11.11)	4 (2.99)	GG vs AA	4.136 (0.959-17.847)	4.13	0.04218
			GG vs (GA+AA)	1.347 (0.629-2.885)	0.59	0.44295
ALELO	CASOS N=1064 n(%)	CONTROLES N=688 n(%)		OR (95% IC)	χ^2	p
G	818 (76.88)	546 (79.36)				
A	246 (23.12)	142 (20.64)		1.156 (0.916 - 1.460)	1.49	0.22200

Cuadro 7.10 Asociación alélica y genotípica del SNP rs9914220 (C/T) del gen SOCS3 en pacientes femeninos con obesidad y controles.

GENOTIPO	CASOS N=361 n(%)	CONTROLES N=206 n(%)		OR (95% IC)	χ^2	p
CC	262 (72.58)	152 (73.79)				
CT	95 (26.32)	46 (22.33)	CC vs CT	1.198 (0.799-1.796)	0.77	0.38114
TT	4 (1.10)	8 (3.88)	CC vs TT	0.290 (0.086-0.979)	4.46	0.03468
			CC vs (CT+TT)	1.064 (0.722-1.566)	0.10	0.75485
ALELO	CASOS N=1100 n(%)	CONTROLES N=684 n(%)		OR (95% IC)	χ^2	p
C	947 (86.09)	582 (85.09)				
T	153 (13.91)	102 (14.91)		0.922 (0.703 - 1.209)	0.35	0.55612

En el análisis de haplotipos, en el que se incluyeron tres SNPs del gen SOCS3 rs7221341 (C/T), rs4969168 (G/A) y rs9914220 (C/T), se observaron 7 diferentes combinaciones presentes con una frecuencia mayor al 1% (Cuadro 7.11). De éstas el haplotipo CAC mostró asociación con un OR=1.68 IC (1.11 – 2.57), p=0.0115. Más aún, al estratificar por gravedad se documentó que este haplotipo confiere riesgo para las formas más graves de la enfermedad: obesidad tipo II [OR=1.97 IC (1.10-3.51), p= 0.0121] y obesidad mórbida [OR=2.05 IC (1.12-3.75), p= 0.0146]. (Cuadro 7.12 y Fig. 7.3).

El análisis evidenció que no existe desequilibrio de ligamiento fuerte entre los tres polimorfismos analizados (Fig. 7.4).

Cuadro 7.11 Frecuencia de las diversas combinaciones posibles de haplotipos.

SNPs rs7221341 rs4969168, rs9914220	FRECUENCIA		OR	p
	CONTROLES n (%)	CASOS n (%)	(95% IC)	
CGC	451 (64.43)	702 (62.79)	0.93 (0.76-1.14)	0.472
TGC	92 (13.14)	144 (12.88)	0.98 (0.73-1.31)	0.8657
CAT	77 (11)	117 (10.47)	0.95 (0.69-1.30)	0.6918
CAC	35 (5)	91 (8.14)	1.68 (1.11-2.57)	0.0115
TAT	17 (2.43)	32 (2.86)	1.18 (0.63-2.24)	0.5577
TAC	17 (2.43)	20 (1.79)	0.73 (0.36-1.47)	0.3459
CGT	11 (1.57)	12 (1.07)	0.68 (0.28-1.66)	0.468

Cuadro 7.12 Asociación del haplotipo CAC con los grados más graves de obesidad.

OR (95% IC)	FRECUENCIA CASOS / CONTROLES, n (%)	OR (95% IC)	P	
	OB TOTAL	91 (8.14) / 35 (5)	1.68 (1.11 - 2.57)	0.0115
	OB I	42 (6.77) / 34 (4.86)	1.42 (0.87 - 2.33)	0.1285
	OB II	24 (9) / 33 (4.71)	1.97 (1.10 - 3.51)	0.0121
	OB III	21 (9.21) / 33 (4.71)	2.05 (1.12 - 3.75)	0.0146
	OB II y OBIII	46 (9.24) / 34 (4.86)u	1.99 (1.23 - 3.23)	0.0029

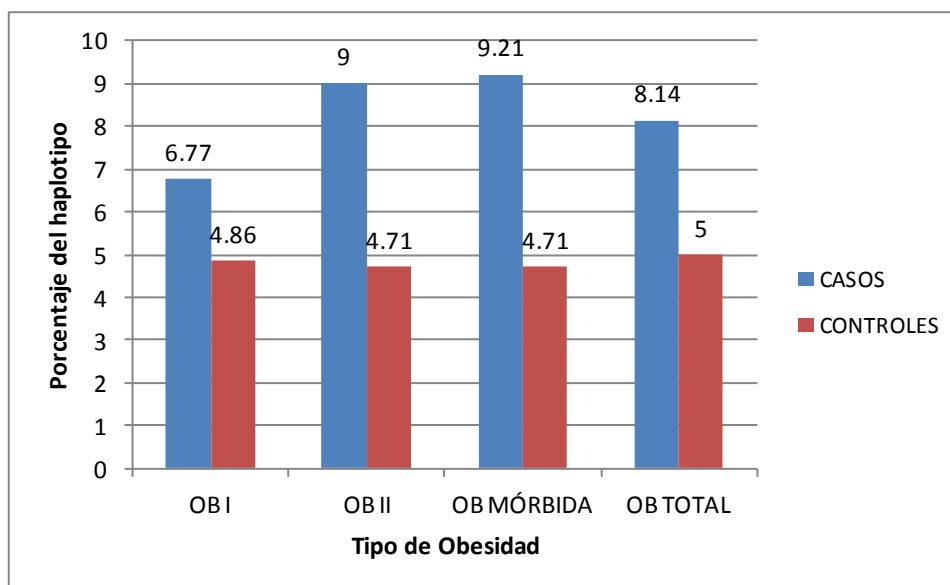


Figura 7.3. Frecuencia del haplotipo CAC en casos y controles.

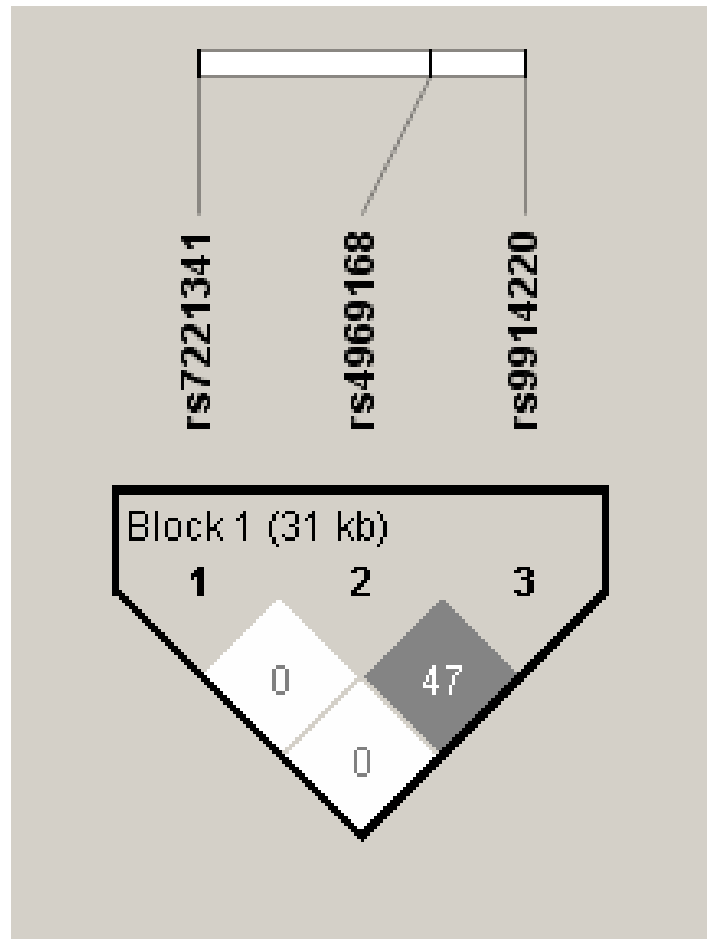


Figura 7.4. Plot de haplotipos del software Haploview®. Este programa permite evaluar el desequilibrio de ligamiento entre los polimorfismos analizados, así como evidenciar si combinaciones entre las variantes se asocian con la enfermedad.

8. DISCUSIÓN

A partir de los datos generados del Proyecto del Genoma Humano, se han derivado diversos estudios cuyo objetivo es elucidar el componente genético involucrado en la etiopatogenia de las enfermedades multifactoriales. Dentro de éstas, la obesidad ha tomado gran relevancia ya que afecta a millones de personas en el mundo y es el principal factor de riesgo para las enfermedades crónico degenerativas más prevalentes en el panorama de salud a nivel mundial.

Actualmente, se conoce que los individuos pueden padecer obesidad como resultado directo de alteraciones genéticas en varias regiones cromosómicas. Dentro de estos factores genéticos se encuentra el gen *SOCS3*, cuyo producto proteico está involucrado en la vía de señalización de la leptina, y se encuentra relacionado específicamente con la hiperleptinemia, fenotipo que tiene como consecuencia un bloqueo constante de la vía de señalización de la leptina y que es un común denominador entre individuos que cursan con obesidad.

En este estudio, el análisis de cuatro polimorfismos en el gen *SOCS3*, documentó que la variante rs2280148(A/C) a diferencia de lo observado en las poblaciones asiática y africana no es informativa para nuestra población. Por otro lado, de los dos alelos del tag SNP rs4969168 (G/A), el alelo A que se encuentra reportado como el ancestral, mostró que en nuestra población tiene una frecuencia menor, contrastante con lo observado en la población africana. Los resultados de este estudio, al igual que lo observado en otras poblaciones apoyan fuertemente que los genes candidatos involucrados en la etiología de las enfermedades comunes, deben ser estudiados con detalle en cada una de las poblaciones.

Es importante mencionar, que el factor principal que puede estar influenciando las discrepancias observadas entre los diferentes estudios, es el criterio de inclusión de los participantes. En este caso en particular, los reportes en la literatura de los estudios donde se han analizado estas variantes, fueron realizados en individuos captados inicialmente para otra patología que no es la obesidad y posteriormente fueron ajustados por IMC y analizados, determinándose así la presencia o no de

asociación. Sin embargo, sería pertinente replicar estos estudios en cohortes con criterios de captación similares para descartar o corroborar la participación de estas variantes en la etiología de la obesidad.

En este sentido, al comparar los valores de los parámetros metabólicos entre los casos y los controles como niveles de glucosa, colesterol triglicéridos así como la presión arterial, observamos diferencias estadísticamente significativas (Anexo 3). Estos datos sugieren una correlación directa entre el IMC y alteraciones en estas variables, lo que en parte podría sustentar el hecho que la obesidad es un factor de riesgo para enfermedades crónicas como la diabetes Tipo II, colesterolemias, trigliceridemias y presión elevada, entre otras. Por otro lado, los datos obtenidos en este trabajo, son concordantes con lo observado en la Encuesta Nacional de Salud 2006, donde se observó mayor susceptibilidad del género femenino a padecer obesidad que en el género masculino, este hecho fue replicado en nuestra población de estudio, dado que el 76% (205/269) de los pacientes que cursaban con obesidad tipo II y tipo III, resultaron mujeres.

Los datos obtenidos también muestran que la edad puede ser una variable determinante en el grado de obesidad de una manera dependiente de género, ya que mientras la obesidad más grave afecta en una edad más temprana a los varones, en mujeres el efecto de esta variable es más acentuado a mayor edad.

Respecto al análisis de asociación el SNP rs9914220, a diferencia de lo reportado en población hispano americana, donde mostró asociación con fenotipos tales como IMC, tejido adiposo visceral y circunferencia de la cintura ^[26], en nuestro análisis observamos que se asoció con protección a obesidad para la población femenina [OR= 0.29 (0.086-0.979), p=0.03468]. Estos datos sugieren que este gen confiere protección para desarrollar obesidad en mujeres de una manera dependiente de género, lo que nos sugiere una participación de factores hormonales involucrados en el mecanismo por el cual *SOCS3* participa en la etiopatogenia de la obesidad. Por su parte, el SNP rs4969168 se asoció con un alto riesgo a desarrollar obesidad al igual que lo reportado en población hispano americana residente en los Ángeles.^[36] Por

último, la variante rs7221341, no mostró asociación con obesidad al igual que lo documentado en otros estudios.

Respecto al análisis de haplotipos, uno, el CAC, conformado por los alelos reportados como los ancestrales de los SNPs rs7221341, rs4969168 y rs9914220, mostró asociación con mayor riesgo a padecer las formas más graves de la enfermedad; obesidad; grado II y III [OR=1.99 (1.23 – 3.23), p=0.003]. Estos datos, nos sugieren que el gen *SOCS3* es un factor genético involucrado tanto en la etiología de la obesidad como en la evolución a las formas más graves de esta entidad en la población mexicana.

El conocimiento generado mediante las nuevas tecnologías moleculares acerca de los factores genéticos, biológicos y bioquímicos involucrados en la etiología de la obesidad, han evidenciado la gran complejidad de esta enfermedad metabólica. A pesar de los esfuerzos realizados por los diferentes grupos de investigación, la información generada sobre los factores genéticos que participan en la etiología de este padecimiento de origen multifactorial es escasa. Sin embargo la aportación específica de cada población al conocimiento científico acerca de la variabilidad genética, puede orientar nuestro camino hacia tratamientos más específicos e individualizados encaminados a disminuir la prevalencia de esta entidad y sus patologías asociadas.

9. CONCLUSIONES

- El género femenino es el más afectado por la obesidad.
- La edad de atención, jugaría un papel fundamental en la prevención de esta enfermedad, dada la correlación de prevalencia de obesidad con respecto a la edad y al género, observada en este estudio en concordancia con lo reportado por la ENSANUT 2006.
- La carga genética continua posicionándose como un importante factor asociado a este padecimiento de origen multifactorial.
- Los polimorfismos de un solo nucleótido rs4969168 y rs9914220 se asocian al riesgo (genotipo AA) y a la protección a obesidad (genotipo TT), respectivamente, en población del distrito federal.
- Un haplotipo (CAC) en el gen SOCS3 confiere riesgo a desarrollar las formas más graves de la enfermedad.
- La variabilidad genética entre poblaciones se continúa demostrando, por lo tanto los genes candidatos involucrados en la etiología de las enfermedades comunes, deben ser estudiados con detalle en cada una de las poblaciones.

10. PROPUESTAS Y RECOMENDACIONES

Las necesidades que la población exige en materia de obesidad, lamentablemente aún no son cubiertas por los diversos sectores de salud en todo el mundo. México, por su parte a través de instituciones como el Instituto Nacional de Medicina Genómica, pone en marcha diversos proyectos que contribuyen al entendimiento de esta enfermedad. Estos proyectos no deben permanecer de manera individual sino formar un ensamblaje que ponga en marcha acciones para el abatimiento y prevención de este padecimiento. Particularmente, esta tesis, puede ser mejorada y continuada si se siguen algunas recomendaciones.

El banco de muestras de obesidad que posee el INMEGEN es numeroso, sin embargo la recolección de mayor cantidad de muestras de casos de varones así como de controles, sería un punto clave para incrementar el poder estadístico de nuestro estudio.

Las nuevas muestras deben ser recolectadas por personal debidamente adiestrado, esto con el fin de minimizar el error humano al momento del registro de cualquiera de los datos, su exactitud debe predominar al momento de tomar los datos de peso y talla, ya que la definición de que una persona se encuentre en un peso adecuado muchas veces depende de centésimos.

Ampliar el número de polimorfismos analizados en este gen así como investigar, si tales polimorfismos se encuentran en desequilibrio de ligamiento con SNPs de genes vecinos en población mexicana también expandiría nuestro panorama en forma prolífica acerca de la heredabilidad de este gen.

Además de esto, sería interesante investigar si existe algún patrón de prevalencia de SNPs en este gen en las diferentes entidades federativas del país y compararlo con algunos otros polimorfismos de genes involucrados en la ingesta de alimentos o con los de alguna otra ruta metabólica relacionada con obesidad.

Con ayuda de ramas de la genómica tales como la nutrigenómica y la epigenómica, se multiplicarían aún más las perspectivas sobre el abordaje de estos y muchos otros polimorfismos que ayudarían a crear el mapa genómico mexicano de la obesidad.

ANEXO 1

(Carta Invitación, Solicitud de consentimiento y Carta de consentimiento informado)

INSTITUTO NACIONAL DE MEDICINA GENÓMICA

LABORATORIO DE GENÓMICA DE ENFERMEDADES MULTIFACTORIALES

CARTA INVITACIÓN

Este documento contiene las preguntas más frecuentes que realizan las personas que participan en un estudio de investigación sobre obesidad.

INFORMACIÓN SOBRE EL ESTUDIO DE INVESTIGACIÓN

El Laboratorio de Genómica de Enfermedades Multifactoriales del Instituto Nacional de Medicina Genómica (INMEGEN) en colaboración con los Departamentos de Endocrinología y de Medicina Interna del Instituto de Seguridad y Servicios Sociales de los Trabajadores del Estado (ISSSTE), están realizando un proyecto de Investigación en pacientes con obesidad intitulado ***“Caracterización de factores genéticos asociados al riesgo de desarrollar obesidad en pacientes mexicanos”***.

¿Cuál es el procedimiento?

El investigador explicará verbalmente a los participantes acerca del objetivo del estudio, aclarará todas las dudas y la forma de participación. Una vez que se acepte colaborar en el estudio se firmará la carta de consentimiento informado y se tomará una muestra de sangre venosa del brazo de cada uno de los participantes utilizando en cada individuo material nuevo y bajo todas las normas de bioseguridad. Se aplicará un cuestionario con preguntas relacionadas con la enfermedad, así como sus antecedentes.

¿Cuál es el propósito de estudio?

El propósito de este proyecto es conocer los factores genéticos que hacen que algunos individuos desarrollen obesidad, cuáles de éstos tienen relación con la susceptibilidad a desarrollar obesidad y cuáles factores genéticos hacen que otras enfermedades comunes (hipertensión arterial, diabetes, cáncer, colesterol alto, etc.) se presenten con frecuencia en los pacientes obesos. Los factores genéticos se heredan de ambos padres, por lo que es posible que en una segunda etapa, podamos extender este estudio a los familiares de primer grado. Es relevante mencionar que también los factores ambientales así como la edad, el sexo y la raza tienen una participación muy importante en el desarrollo de la obesidad. Es decir, para que la obesidad se presente es necesario que las personas que son genéticamente susceptibles se expongan a factores ambientales adversos (tipo de alimentación, estrés, no hacer ejercicio, etc).

¿Quién participa en este estudio?

Todas las personas que tengan diagnóstico clínico de obesidad y los controles voluntarios sin obesidad que cumplan con los criterios de inclusión.

El diagnóstico de obesidad será establecido por un médico endocrinólogo o internista, quienes los canalizarán al Laboratorio de Enfermedades Multifactoriales para su estudio genético.

¿Por qué debería yo considerar mi participación en el estudio?

Porque para determinar los factores genéticos que predisponen al desarrollo de la obesidad es necesario analizar muestras de pacientes que padecen de obesidad así como de individuos que no la padecen, que no presentan esta patología. Esta información nos permitirá conocer y entender las bases genéticas de la obesidad y en un futuro, con la información generada de este estudio esperamos identificar personas que aún no están enfermas pero que tienen un alto riesgo de desarrollar

obesidad, a los cuales les podemos sugerir medidas que disminuyan el riesgo de padecerla.

¿Tengo necesariamente que participar en el estudio? Si acepto participar, puedo cambiar de opinión o retirarme?

No es obligatorio participar en el estudio. Su colaboración en la investigación es completamente voluntaria y puede retirarse de ella cuando lo desee. Si después de aceptar decide salirse del estudio, toda la información recopilada será destruida y su decisión no tendrá ninguna repercusión en su atención o la de sus familiares en las Instituciones participantes.

¿En qué consiste mi participación?

Cada persona que participe en este estudio debe donar una muestra de 20 ml de sangre periférica para extraer el DNA (en el DNA se encuentran los genes que contienen toda la información que se hereda del papá y de la mamá y que pueden conferir un riesgo para desarrollar obesidad). Además, los pacientes responderán a una serie de preguntas sobre su enfermedad y otros antecedentes patológicos. El reclutamiento de los pacientes será por un médico endocrinólogo o un médico internista quienes plantearán las preguntas al momento de la consulta. Este procedimiento tomará aproximadamente de 20 a 30 min.

¿Qué peligros podría experimentar en este estudio y que harán los investigadores para reducir el riesgo de que estos se presenten?

Su participación en el estudio representa un riesgo mínimo, ya que ninguno de los participantes tendrá que tomar medicamentos ni someterse a ningún otro tipo de estudio. Aunque es poco probable, se podría formar un pequeño hematoma o

moretón en el área de punción después de que se ha obtenido la muestra de sangre. Para disminuir este riesgo, la muestra será tomada por personal con amplia experiencia en obtención de muestras de sangre periférica.

¿Qué harán los investigadores para asegurar que la información que recolecten de mi no caiga en manos equivocadas?

Para mantener la confidencialidad de sus datos, inmediatamente después de que ingresen al estudio, se asignarán códigos de identificación para cada una de las muestras de los participantes, así como el de los cuestionarios realizados. Esta información y la derivada del estudio genético serán manejadas únicamente por los investigadores involucrados y solamente será dada a conocer a otra persona si usted como paciente lo solicita por escrito.

¿Qué beneficios personales puedo esperar al participar en este estudio?

Es importante señalar, que la muestra que se obtenga es una donación voluntaria por lo que su colaboración en el proyecto no le dará ningún beneficio económico, ni repercutirá en su manejo clínico dado que este estudio se encuentra en una fase experimental; sin embargo existe la posibilidad de que en un futuro, con los resultados obtenidos en este estudio otros pacientes se beneficien de mejores métodos de diagnóstico y de tratamiento.

¿Quién guardará el consentimiento informado una vez que lo he firmado?

La carta de consentimiento informado será archivada bajo llave en el Laboratorio de Genómica de Enfermedades Multifactoriales, del Instituto Nacional de Medicina Genómica por la M. en C. Yolanda Saldaña y la Dra. Lorena Orozco.

¿A quién debo acudir en caso de dudas?

Para aclarar las dudas que se le presente en cualquier momento, puede solicitar una cita al Tel. 5350-1957 o 5350-1962 con la M. en C. Yolanda Saldaña y la Dra. Lorena Orozco, ambas investigadores del Laboratorio de Genómica de Enfermedades Multifactoriales del Instituto Nacional de Medicina Genómica.

INSTITUTO NACIONAL DE MEDICINA GENÓMICA

LABORATORIO DE GENÓMICA DE ENFERMEDADES MULTIFACTORIALES

SOLICITUD DE CONSENTIMIENTO PARA PARTICIPAR EN EL ESTUDIO

Solicitamos de la manera más atenta su participación en este proyecto de Investigación en el que se desea conocer las características genéticas de la obesidad en la población Mexicana. Las responsables de este proyecto son la M. en C. Yolanda Saldaña y la Dra. Lorena Orozco, Investigadoras del Instituto Nacional de Medicina Genómica (INMEGEN) y se está realizando en colaboración con el Instituto de Seguridad y Servicios Sociales de los Trabajadores del Estado (ISSSTE).

Sugerimos que antes de decidir si participa o no, utilice todo el tiempo necesario para hacer preguntas acerca de la investigación y comentar con el entrevistador las dudas relacionadas con los riesgos y beneficios que involucran su participación.

Finalmente, si considera que la información que le ofrecemos es suficiente le invitamos a colaborar con nuestro estudio llenando la siguiente carta:

**CARTA DE CONSENTIMIENTO INFORMADO PARA PARTICIPANTES
VOLUNTARIOS.**

México, D. F. a _____ de _____ de 200____

Por medio de la presente hago constar que yo
_____ estoy de acuerdo en participar en el
proyecto de investigación “Caracterización de factores genéticos asociados al riesgo de
desarrollar obesidad en pacientes mexicanos”.

Estoy enterado de que mi participación en el estudio consistirá únicamente en donar
una muestra de sangre venosa y responder preguntas relacionadas con mi salud.

Me han explicado que la sangre será tomada de una vena del brazo con todos los
requisitos de seguridad, como el uso de material nuevo y por personal calificado, por lo
que no representa un riesgo mayor para mí y que la única molestia que podría
presentarse es la aparición de un pequeño hematoma o moretón que desaparecerá en
días. Así mismo, me han comentado que la información obtenida del estudio genético y
del cuestionario es absolutamente confidencial y que esta información será manejada
únicamente por los investigadores.

Estoy consciente de que mi participación en el estudio es completamente voluntaria,
que participar no implica pago o retribución alguna y que si en medio del proceso decido
no continuar, toda la información recopilada será eliminada.

He leído la información descrita y mis preguntas acerca del estudio han sido
respondidas satisfactoriamente.

Atentamente

Firma del participante (No. Telefónico)

Nombre y firma del Testigo

Nombre y firma del Testigo

He entregado a la persona que participará voluntariamente como control la información precisa y necesaria sobre los objetivos del proyecto, riesgos, beneficios y derechos que tiene. Declaro que su decisión de participar en el estudio ha sido tomada de manera libre, sin presiones o influencias de ningún tipo y soy testigo de que esta carta ha sido firmada por él.

ANEXO 2

(Fundamento de las sondas TaqMan®)

Acerca de las sondas TaqMan MGB:

Cada sonda contiene:

- Un fluorocromo reportero en el extremo 5 'de cada sonda
 - VIC ® está ligado al extremo 5 'de la sonda del alelo 1.
 - FAM ™ está ligado al extremo 5 'de la sonda del alelo 2.
- Partícula de unión al surco menor (MGB, por sus siglas en inglés, *Minor Groove Binder*) en el extremo 3 'de cada sonda. Esta modificación aumenta la temperatura de fusión (T_m) para una determinada longitud de la sonda, lo que permite el diseño de sondas más pequeñas. Sondas más pequeñas resultan en mayores diferencias en los valores de T_m entre emparejadas y no emparejadas, produciéndose así una discriminación alélica más robusta.
- Un apagador no fluorescente en el extremo 3' de cada sonda.

Ensayo de la 5 ' exonucleasa

Durante la PCR, ocurren los siguientes pasos:

1. Cada sonda MGB TaqMan alinea específicamente con su secuencia complementaria.
2. Cuando la sonda de oligonucleótido está intacta, la proximidad entre el reportero y el quencher resulta en la represión de la fluorescencia del reportero, esto principalmente por la transferencia de energía tipo Förster.
3. La ADN polimerasa AmpliTaq Gold® extiende la unión de los cebadores hacia el ADN templado.
4. La ADN polimerasa AmpliTaq Gold® escinde sólo las sondas que son hibridizadas con el blanco.

5. Cuando el fluorocromo reportero se escinde del apagador ocurre un incremento en la señal de fluorescencia.
6. El aumento en la señal de fluorescencia se produce cuando las sondas que han hibridado con la secuencia complementaria de ADN, se escinden. Así, la señal de fluorescencia generada por la amplificación por PCR indica que alelos están presentes en la muestra.

Incremento en	Indica
Únicamente fluorescencia de VIC	Homocigocidad para el alelo 1
Únicamente fluorescencia de FAM	Homocigocidad para el alelo 1
Fluorescencia de ambos marcadores, VIC y FAM.	Heterocigocidad. Presencia del alelo 1 y 2.

Modificado de [32].

ANEXO 3

(Características generales de la población de estudio)

Características generales de la población de estudio.

Características Generales Población de Estudio				
	Pacientes Obesos		Controles	Valor p
N (mujeres/hombres)	355 (65%)/189 (35%)		231 (62%)/ 142 (38%)	0.06
Edad (años)	45.4 (±9.6)		40.7 (±8.6)	<0.001
Mujeres (media y rango intercuartílico)	35.2 (7.9)		23.1 (2.5)	<0.001
Hombres (media y rango intercuartílico)	32.8 (5.1)		23.9 (2.1)	<0.001
Glucosa (mmol) (media, d.e.)	108.5 (35.9)		89.8 (11.8)	<0.001
Colesterol (mmol) (media, d.e.)	194.2(38.7)		177.4(34.7)	<0.001
Triglicéridos (mmol) (media, d.e.)	202.9 (116.4)		132.3 (91.7)	<0.001
Presion Sanguínea Sistolica (mmHg) (media, d.e.)	125 (15.4)		110.5 (11.8)	<0.001

11. REFERENCIAS

1. SS, México. Programas y estrategias: Sobrepeso y obesidad. [Monografía en internet]. México: Secretaría de Salud. Estrategia contra el sobrepeso y obesidad. [Citado: Febrero 6 de 2011]. Disponible en http://portal.salud.gob.mx/contenidos/temas_interes/salud_alimentaria.html
2. OMS. Centro de prensa. Temas de salud. Información general. Obesidad y sobrepeso. [Monografía en internet]. Organización mundial de la salud. [Última actualización febrero 2011]. Centro de prensa. Obesidad y sobrepeso. Nota descriptiva 311. Disponible en: <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs311/es/index.html>
3. Santos JL, Martínez JA, Pérez F, Albala C. Epidemiología genética de la obesidad: estudios familiares. *Rev Méd Chile*. 2005; 133: 349-361.
4. Bastarrachea RA, Cole SA, Comuzzie AG. Genómica de la regulación del peso corporal: mecanismos moleculares que predisponen a la obesidad. *Med Clin (Barc)* 2004;123(3):104-17.
5. Rankinen T, Zuberri A, Chagnon YC, Weisnagel SJ, Argyropoulos G, Walts B, et al. The human obesity gene map: The 2005 update. *Obesity*. 2006. Apr; 4 (14): 529-644.
6. Elks CE, Loos RJF, Sharp SJ, Langenberg C, Ring SM, Timpson NJ, et al. Genetic markers of adult obesity risk are associated with greater early infancy weight gain and growth. *PLoS Med*. 2010. 7(5): e1000284. doi:10.1371/journal.pmed.1000284. Disponible en: <http://www.plosmedicine.org/article/info%3Adoi%2F10.1371%2Fjournal.pmed.1000284>
7. Blakemore AIF, Froguel P. *Ann. N.Y. Acad. Sci.* 1214 (2010) 180–189. doi: 10.1111/j.1749-6632.2010.05880.x
8. World Health Organization. Global database on body mass index. BMI classification. Base de datos mundial de la OMS sobre Índice de Masa Corporal. [Monografía en internet]. [Citado: 1 de febrero 2012]. Disponible en: http://apps.who.int/bmi/index.jsp?introPage=intro_3.html

9. Organización Mundial de la Salud. Patrones de crecimiento infantil. Estudio multicéntrico de la OMS sobre el patrón de crecimiento (EMPC). [Monografía en internet] [Citado: 1 de Febrero de 2012]. Disponible en: <http://www.who.int/childgrowth/mgrs/es/>
10. Sevilla S. Metodología de los estudios de asociación genética. *Rev Insuf Cardíaca* 2007; 2 (3):111-114.
11. Burton PR, Tobin MD, Hopper JL. Genetic epidemiology 1: Key concepts in genetic epidemiology. *Lancet* 2005; 366: 941–51.
12. Luque J, Herráez A. Texto ilustrado de biología molecular en ingeniería genética. Madrid: Harcourt. 2001. Tema 26 Diversidad del genoma: polimorfismos. p. 365-66.
13. Moreno B, Monereo S, Álvarez J. La obesidad en el tercer milenio. 3ra ed. Madrid: Médica Panamericana. 2004. p. 14, 15, 57.
14. Bell CG, Walley AJ, Froguel P. The genetics of human obesity. *Nat Rev Genet.* 2005 Mar; 6(3):221-34. doi:10.1038/nrg1556.
15. Knobelspies H, Zeidler J, Hekerman P, Bamberg-Lemper S, Becker W. Mechanism of attenuation of leptin signalling under chronic ligand stimulation. *BMC Biochemistry* 2010, 11(2). doi:10.1186/1471-2091-11-2. Disponible en: <http://www.biomedcentral.com/1471-2091/11/2>
16. Zhang Y, Proenca R, Maffei M, Barone M, Leopold L, Friedman JM. Positional cloning of the mouse obese gene and its human homologue. *Nature* 1994; 372: 425-432
17. Sánchez JC. Perfil fisiológico de la leptina. *Colombia Médica* 2005; 36: 50-59.
18. Lodish H et al. *Biología celular y molecular*. 5ta ed. Buenos aires: Médica Panamericana. 2005. Capítulo 14. Vías de señalización que controlan la actividad génica. p. 571-586.
19. Frigolet ME. Señalización de la leptina. *REB* 2006. 25(2): 50-54. Disponible en: <http://redalyc.uaemex.mx/src/inicio/ArtPdfRed.jsp?iCve=49025203>.
20. Sahu A. Leptin signaling in the hypothalamus: emphasis on energy homeostasis and leptin resistance. *Frontiers in Neuroendocrinology* (2004) 24. 225–253.

21. Sahu A. Minireview: A hypothalamic role in energy balance with special emphasis on leptin. *Endocrinology* 2004. 145(6): 2613-2620.
22. Croker BA, Kiu H, Nicholson SE. SOCS regulation of the JAK/STAT signaling pathway. *Semin Cell Dev Biol* 2008; 19(4):414 – 422.
23. Ramadhinara A, Widia F, Soegondo S, Setiawati A. The role of SOCS3 in leptin resistance and obesity. *Acta Med Indones-Indones J Intern Med* 2008-, 40 (2): 89-95.
24. Frühbeck G. Intracellular signaling pathways activated by leptin. *Biochem. J.* 2006; **393**: 7–20. doi:10.1042/BJ20051578.
25. Münzberg H, Myers MGJ. Molecular and anatomical determinants of central leptin resistance. *Nature Neuroscience* 2005; 8, 566 – 570.
26. Talbert ME, Langefeld CD, Ziegler J, Mychaleckyj JC, Haffner SM, Norris JM, et al. Polymorphisms near SOCS are associated with obesity and glucose homeostasis traits in Hispanic Americans from the insulin resistance atherosclerosis family study. *Hum Genet.* 2009 Mar; 125(2): 153–162. doi:10.1007/s00439-008-0608-3. Disponible en: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2804661/?tool=pmcentrez>.
27. Jamshidi Y, Snieder H, Wang X, Spector TD, Carter ND, O'Dell SD. Common polymorphisms in the SOCS3 gene are not associated with body weight, insulin sensitivity or lipid profile in normal female twins. *Diabetologia.* 2006 Feb ; 49(2): 306–310.
28. Hölter K, Wermter AK, Scherag A, Siegfried W, Goldschmidt H, Hebebrand J. Analysis of sequence variations in the suppressor of cytokine signaling (SOCS)-3 gene in extremely obese children and adolescents. *BMC Medical Genetics* 2007, 8 (21) doi:10.1186/1471-2350-8-21.
29. Fischer-Rosinsky A, Fisher E, Kovacs P, Blüher M, Möhlig M, Pfeiffer AFH. Lack of Association between the Tagging SNP A+930→G of SOCS3 and Type 2 Diabetes Mellitus: Meta-Analysis of Four Independent Study Populations. *Plos one* 2008. 3(12): e3852. doi:10.1371/journal.pone.0003852

30. International HapMap Project. HapMap Genome Browser release #28 (Phases 1, 2 & 3 - merged genotypes & frequencies) [Citado: Febrero 4 de 2012]. Disponible en: <http://hapmap.ncbi.nlm.nih.gov/>
31. Applied biosystems. TaqMan® SNP Genotyping & Copy Number Assays. TaqMan® SNP Genotyping Assay Sets. Assay Search. [Monografía en internet]. [Citado: 2 de Febrero de 2012]. Disponible en: appliedbiosystems.com
32. Taqman SNP genotyping assays protocol. Part Number 4332856.
33. Hardy Weinberg equilibrium. [Monografía en internet]. Disponible en: <http://ihg.gsf.de/cgi-bin/hw/hwa1.pl>
34. Instituto Nacional de Salud Pública. Resultados de la ENSANUT 2006. Secretaría de Salud. p. 69.
35. DbSNP Short Genetic Variations, National Center of Biotechnology Information, NCBI. [Monografía en internet] [Citado: 4 de Febrero de 2012]. Disponible en: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/projects/SNP/>
36. Tang W, Zou JJ, Chen XF, Zheng JY, Zeng HZ, Liu ZM, Shi YQ. Association of two polymorphisms within and near SOCS3 gene with obesity in three nationalities in Xinjiang province of China. Acta Pharmacol Sin. 2011 32(11):1381-6. doi: 10.1038/aps.2011.84.