



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE
MÉXICO**

**FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES
ZARAGOZA**

**EFFECTO DE LOS PARÁMETROS BIOQUÍMICOS Y
GENÓMICOS SOBRE LA EXPRESIÓN GÉNICA DE
TGF-β1, *IGF2BP2* Y *SOD2*, EN UNA POBLACIÓN
INFANTIL MEXICANA.**

T E S I S

PARA OBTENER EL GRADO DE:

QUÍMICO FARMACÉUTICO BIÓLOGO

PRESENTA:

MIRIAN SOON PÉREZ



DIRECTOR: DR. FERNANDO SUÁREZ SÁNCHEZ

ASESORA: DRA. CATALINA SORIANO CORREA

MÉXICO, D.F.

JUNIO 2015.



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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



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.



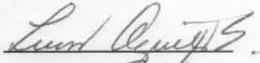
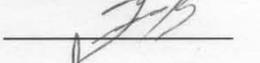
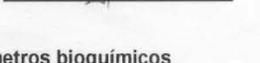
UNIVERSIDAD NACIONAL
AUTÓNOMA DE
MÉXICO

FACULTAD DE ESTUDIOS
SUPERIORES "ZARAGOZA"

DIRECCIÓN

JEFE DE LA UNIDAD DE ADMINISTRACIÓN
ESCOLAR
PRESENTE.

Comunico a usted que la alumna SOON PÉREZ MIRIAN,
con número de cuenta 40906836-4 de la carrera de Q. F. B.,
se le ha fijado el día 22 del mes de Junio de 2015 a las 09:00 hrs.,
para presentar examen profesional, que tendrá lugar en la sala de exámenes
profesionales Campus II de esta Facultad, con el siguiente jurado:

PRESIDENTE	MTRA. LEONOR AGUILAR SANTELISES	
VOCAL *	DR. FERNANDO SUÁREZ SÁNCHEZ	
SECRETARIO	DRA. CATALINA SORIANO CORREA	
SUPLENTE	Q.F.B FRANCISCO JAVIER PARADA GARCÍA	
SUPLENTE	Q.F.B. MIRIAM HINOJOSA MORALES	

El título de la tesis que se presenta es: **Efecto de los parámetros bioquímicos y genómicos sobre la expresión génica de TGF- β 1, IGF2BP2 y SOD2, en una población infantil mexicana.**

Opción de titulación: **Tesis Experimental**

ATENTAMENTE
"POR MI RAZA HABLARÁ EL ESPÍRITU"
México, D.F. a 27 de Mayo de 2015.

DR. VÍCTOR MANUEL MENDOZA NÚÑEZ

DIRECTOR
ZARAGOZA
DIRECCION

RECIBÍ:
OFICINA DE EXÁMENES PROFESIONALES
Y DE GRADO

Vo.Bo. 
DRA. RAQUEL RETANA UGALDE
JEFA DE LA CARRERA DE Q.F.B.

DEDICATORIA

Hay de todos los tamaños, todos son diferentes, algunos nos hacen llorar y otros gritar, pero la vida no tendría sentido sin ellos. Porque los retos nos permiten crecer, aventurarnos en mundos desconocidos, porque nos dejan conquistarlos y sentir la confianza que una vez perdimos. Ante la adversidad más robusta y la soledad más profunda, un pequeño cambio puede ser la diferencia, un cambio que inicia en ti y termina en el éxito.

Dedico este trabajo a mí misma para recordar que siempre existe un camino, que el error es humano y que las adversidades fueron creadas para ser superadas, porque del peor escenario puedes crear el mejor papel. Que lo único que se necesita en la vida para ser exitoso es constancia y confiar en uno mismo.

Nuestra mayor gloria no está en no haber caído nunca, sino en levantarnos cada vez que lo hicimos.

Oliver Goldsmith

AGRADECIMIENTOS PERSONALES

A **mis padres** por apoyarme en los momentos más difíciles de mi vida, por brindarme la oportunidad de crecer en un ambiente amoroso y por enseñarme a ser una persona amable, humilde y perseverante.

A **Víctor** por extenderme su mano cada vez que me caía, por escucharme y apoyarme cuando el mundo me parecía más oscuro. Porque no solo eres mi pareja, eres mi amigo, mi compañero, un lugar al cual pertenecer.

A **mi director, el Dr. Fernando** por enseñarme a buscar caminos diferentes ante un problema, por permitirme creer más en mi misma apoyándome con palabras de aliento; por su paciencia y su dedicación

A **mi asesora, la Dra. Catalina** por las largas horas de plática enseñándome que en la vida las cosas no llegan si no las buscas por ti mismo. Por brindarme la oportunidad de mejorar en mis puntos débiles gracias a su honestidad.

Al **Dr. Jaime** por darme siempre un empujón para olvidar mis miedos y superar los retos, por su honestidad y por sus conocimientos.

A **mis amigas** que estuvieron cada vez que las necesite, porque con sus duras palabras me hicieron enfrentar mis problemas, las quiero mucho, desde lo más profundo de mi corazón les doy las gracias.

Las personas siempre entran y salen de tu vida pero son solo algunas las que se recuerdan. Les agradezco a cada uno de ustedes, les deseo lo mejor en la vida, porque personas como ustedes merecen felicidad, éxito y bienestar.

Gracias...

AGRADECIMIENTOS INSTITUCIONALES.

A la **Comisión Nacional de Ciencia y Tecnología** (CONACYT) por el financiamiento del proyecto “Genética de la Obesidad Infantil y Adolescente” con calve de registro FIS/IMSS/PRI0/10/011 del cual deriva este trabajo.

A la **Unidad de Investigación Médica en Bioquímica** del Hospital de Especialidades Bernardo Sepúlveda, en el Centro Médico Nacional Siglo XXI, IMSS, por prestar sus instalaciones para realizar este trabajo.

Al **Área de Química Computacional y Modelación Molecular** de la FES Zaragoza, parte de la Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM) por prestar sus instalaciones y recursos para la elaboración de este trabajo.

A la **carrera de Química Farmacéutico Biológica** de la Facultad de Estudios Superiores Zaragoza por la preparación académica brindada.

ÍNDICE

1. ÍNDICE DE FIGURAS.....	8
2. ÍNDICE DE TABLAS	10
3. ABREVIATURAS	12
4. RESUMEN	14
5. INTRODUCCIÓN	16
6. MARCO TEÓRICO	18
6.1. NOCIONES DE GENÉTICA	18
6.2. POLIMORFISMOS DE UN SÓLO NUCLEÓTIDO	21
6.3. OBESIDAD.....	23
6.4. SÍNDROME METABÓLICO	27
6.5. LA OBESIDAD Y SUS COMPLICACIONES	29
6.6. GEN <i>TGF-β1</i>	34
6.7. GEN <i>IGF2BP2</i>	36
6.8. GEN <i>SOD2</i>	38
7. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA.....	40
8. HIPÓTESIS.....	41
9. OBJETIVOS	42
9.1. OBJETIVO GENERAL	42
9.2. OBJETIVOS PARTICULARES	42
10. DISEÑO DE ESTUDIO	43
11. MATERIALES Y MÉTODOS	45
11.1. DATOS ANTROPOMÉTRICOS Y BIOQUÍMICOS.....	45
11.2. ELECCIÓN DE SNPs EN POSIBLES SITIOS REGULADORES DE LA TRANSCRIPCIÓN.....	46
11.3. EXTRACCIÓN DE DNA	48
11.4. GENOTIPIFICACIÓN	48
11.5. EXTRACCIÓN DE RNA TOTAL	50
11.6. TRATAMIENTO CON DNasa	51
11.7. SÍNTESIS DE cDNA.....	51
11.8. EXPRESIÓN RELATIVA.....	52
11.9. ANÁLISIS ESTADÍSTICO	54

12. RESULTADOS	56
12.1. ANTROPOMETRÍA Y BIOQUÍMICA.....	56
12.2. EXTRACCIÓN DE DNA	58
12.3. EXTRACCIÓN DE RNA	59
12.4. RESULTADOS DEL GEN <i>TGF-β1</i>.....	60
12.5. RESULTADOS DEL GEN <i>IGF2BP2</i>	70
12.6. RESULTADOS DEL GEN <i>SOD2</i>	76
13. DISCUSIÓN	82
14. CONCLUSIONES	88
15. PERSPECTIVAS	89
16. GLOSARIO	90
17. ANEXOS.....	91
18. REFERENCIAS	101

1. ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Esquema de algunos niveles de organización del genoma	18
Figura 2. Dogma central de la biología molecular	19
Figura 3. La obesidad; su asociación con DT2 y sus comorbilidades	25
Figura 4. Esquema; división de resultados por secciones para cada gen.....	54
Figura 5. Gel de agarosa al 0.8 %.....	58
Figura 6. Electroforesis de RNA total en un gel de agarosa al 1%	59
Figura 7. Genotipificación del rs1800470.....	60
Figura 8. Expresión génica de <i>TGF-β1</i> vs el diagnóstico de obesidad	62
Figura 9. Expresión génica de <i>TGF-β1</i> vs el genotipo del rs1800470.....	65
Figura 10. Glucosa vs el genotipo del rs1800470.....	67
Figura 11. Colesterol total vs el genotipo del rs1800470.....	68
Figura 12. LDL vs el genotipo del rs1800470.....	68
Figura 13. Genotipificación del rs4402960.....	70
Figura 14. Expresión génica de <i>IGF2BP2</i> vs el diagnóstico de obesidad.....	72
Figura 15. Expresión génica de <i>IGF2BP2</i> vs el genotipo del rs4402960	74
Figura 16. Genotipificación del rs4880.....	76
Figura 17. Expresión génica de <i>SOD2</i> vs el diagnóstico de obesidad	78

Figura 18. Expresión génica de <i>SOD2</i> vs el genotipo del rs4880	80
Figura 19. Percentiles de IMC por edad en varones.....	91
Figura 20. Percentiles de IMC por edad para mujeres	92
Figura 21. Genotipificación con SNP <i>genotyping</i> Taqman.....	93
Figura 22. Sondas Taqman	94
Figura 23. Ruptura de una sondas Taqman por la polimerasa	95
Figura 24. Representación del umbral y C_t en una amplificación por RCR	97
Figura 25. Eficiencia de una reacción en PCR	98

2. ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Clasificación de SNPs funcionales.....	21
Tabla 2. Ejemplo de SNPs asociados a diversas enfermedades	23
Tabla 3. Criterios de Ferranti.....	28
Tabla 4. Criterios de inclusión y exclusión.....	43
Tabla 5. Percentiles de IMC de acuerdo a la CDC	44
Tabla 6. Parámetros utilizados de la base de datos del proyecto GOIA.....	46
Tabla 7. SNPs en posibles regiones reguladoras de la transcripción.....	47
Tabla 8. Polimorfismos de un solo nucleótido estudiados en este trabajo	49
Tabla 9. Condiciones de PCR.....	49
Tabla 10. Condiciones de temperatura para la síntesis de cDNA.....	52
Tabla 11. Características de los cebadores utilizados.....	52
Tabla 12. Reactivos y cantidades para cada reacción de PCR	53
Tabla 13. Parámetros antropométricos y bioquímicos	56
Tabla 14. Clasificación por genotipo del rs1800470.....	60
Tabla 15. Expresión génica de <i>TGF-β1</i> vs parámetros bioquímicos	64
Tabla 16. Genotipo del rs1800470 vs parámetros bioquímicos	66
Tabla 17. Clasificación por genotipo del rs4402960.....	70

Tabla 18. Expresión génica de <i>IGF2BP2</i> vs parámetros bioquímicos	73
Tabla 19. Genotipo del rs4402960 vs parámetros bioquímicos	75
Tabla 20. Clasificación por genotipo del rs4880.....	76
Tabla 21. Expresión génica de <i>SOD2</i> vs parámetros bioquímicos	79
Tabla 22. Genotipo del rs4880 vs parámetros bioquímicos	81
Tabla 23. Reactivos para genotipificación	94

3. ABREVIATURAS

AGNEs	Ácidos grasos no esterificados	ExO	Expresión génica vs diagnóstico de obesidad
ALT	Alanino aminotransferasa	ExP	Expresión génica vs parámetros bioquímicos
AP2	Factor de transcripción alfa	<i>FTO</i>	Gen asociado con obesidad y masa grasa
ATP	Adenosin trifosfato	GLUT-4	Transportador de glucosa 4
c. b. p.	Cuanto baste para	GOIA	Proyecto de genética de la obesidad infantil y adolescente
CDC	Centro para el control y prevención de enfermedades	GP	Genotipo vs parámetros bioquímicos
cDNA	Ácido desoxirribonucleico complementario	GWAS	Estudios de asociación en todo el genoma
cSNP	Polimorfismo de un solo nucleótido codificante	H ₂ O ₂	Peróxido de hidrogeno
Ct	Ciclo que sobrepasa el umbral	HDL	Lipoproteína de alta densidad
CXCL5	Ligando 5 para quimosina	HGNA	Hígado graso no alcohólico
D´	Desequilibrio de ligamiento	ICAM	Molécula de adhesión intracelular 1
DNA	Ácido desoxirribonucleico	IDF	Federación internacional de diabetes
DT2	Diabetes tipo 2	IFN-γ	Interferón gamma
ECV	Enfermedades cardiovasculares	IGF2	Factor de crecimiento similar a la insulina 2
ELISA	Ensayo de inmunoabsorción ligado a enzimas	IGF2BP2	Proteína 2 de unión al factor de crecimiento similar a la insulina 2
ENSANUT	Encuesta nacional de salud y nutrición	IL-1	Interleucina 1
ExG	Expresión génica vs genotipo		

IL-1 β	Interleucina 1 beta	PCR	Reacción en cadena de la polimerasa
IL-4	Interleucina 4	PGK1	Fosfoglicerato cinasa
IL-6	Interleucina 6	qPCR	Reacción en cadena de la polimerasa cuantitativa
IMC	Índice de masa corporal	RNA	Ácido ribonucleico
IR	Resistencia a la insulina	ROS	Especies reactivas del oxígeno
KCTD15	Canal de potasio que contiene el dominio de tetramerización	rpm	Revoluciones por minuto
LDL	Lipoproteína de baja densidad	rSNP	Polimorfismo de un solo nucleótido regulador
LDLox	Lipoproteína de baja densidad oxidada	SM	Síndrome metabólico
MC4R	Receptor 4 de melanocortina	SNP(s)	Polimorfismo(s) de un solo nucleótido
MCP-1	Proteína quimioatrayente de monocitos 1	SOD2	Superóxido dismutasa mitocondrial
MEC	Matriz extracelular	Sp-1	Factor de transcripción Sp1
mmHg	Milímetros de mercurio	srSNP	Polimorfismo de un solo nucleótido estructural
mRNA	Ácido ribonucleico mensajero	TGF- β 1	Factor de crecimiento transformante beta 1
O ₂ ⁻	Anión superóxido	TNF- α	Factor de necrosis tumoral alfa
OH ⁻	Hidroxilo	UTR	Región no codificante
OMS	Organización mundial de la salud	VCAM	Molécula de adhesión vascular
b	Bases nitrogenadas	YY1	Factor de transcripción ying yang 1

4. RESUMEN

La obesidad es una enfermedad metabólica, que facilita la aparición de diabetes tipo 2 (DT2) y enfermedades cardiovasculares (ECV). Su incidencia en la población infantil ha aumentado en los últimos años, lo que la ha convertido en un problema mundial de salud pública, ya que se sabe que la incidencia de DT2 y ECV es mayor en personas que presentaron obesidad durante su niñez.

Cada una de estas enfermedades tiene orígenes multifactoriales, donde el estilo de vida y la genética de cada individuo facilitan su desarrollo. La genética puede causar alteraciones en la homeostasis del metabolismo propiciando la aparición tanto de DT2 como de sus complicaciones (ECV, nefropatía, retinopatía y neuropatía). Por tal motivo, en este trabajo estudiamos si la expresión de tres genes asociados a DT2 o a sus complicaciones (genes: *TGF-β1*, *IGF2BP2* y *SOD2*) correlacionan con el genotipo de tres polimorfismos de un solo nucleótido o SNPs (rs1800470, rs4402960 y rs4880), algunos parámetros bioquímicos y/o antropométricos, en una población infantil de la ciudad de México. Para ello se seleccionaron 115 niños de entre 6 y 14 años de la base de datos del proyecto, genética de la obesidad infantil y adolescente (GOIA, por sus siglas), a los que a partir de sangre periférica se les determinó el genotipo de los SNPs de interés, posteriormente, se eligieron entre 8 y 12 muestras de los niños homocigotos para cada SNP para realizar la extracción de ácido ribonucleico (RNA) total, el cual se utilizó para sintetizar ácido desoxirribonucleico complementario (cDNA), y a continuación se determinó la expresión génica por medio de reacción en cadena de la polimerasa cuantitativa (qPCR) y *Syber Green*. Además, de la base de GOIA se tomaron algunos parámetros antropométricos y bioquímicos tales como: índice de masa corporal (IMC), circunferencia de la cintura, glucosa, colesterol total, triglicéridos, lipoproteína de alta densidad (HDL), lipoproteína de baja densidad (LDL) e insulina.

Los resultados mostraron que el grupo de niños con obesidad presentaron niveles elevados de insulina ($p= 0.01$), triglicéridos ($p < 0.0001$), LDL ($p= 0.02$) y niveles bajos

de HDL ($p= 0.002$), este último únicamente en varones. Además, el genotipo TT (individuos que tienen en sus dos alelos Timina) del rs1800470 se asoció con niveles altos de ácido ribonucleico mensajero (mRNA) del gen *TGF- β 1* ($p= 0.003$) y con altos niveles de colesterol total ($p= 0.02$) y LDL ($p= 0.03$). Asimismo, los genotipos TT y CT (individuos que tienen en un alelo Timina y en el otro Citosina) se asociaron con altos niveles de glucosa en comparación con el CC ($p= 0.04$ y $p= 0.0008$ respectivamente). Por otra parte, no se encontró relación entre los rs4402960 (*IGF2BP2*, asociado a resistencia a la insulina) y rs4880 (*SOD2*, relacionado con estrés oxidativo) con los parámetros bioquímicos, expresión génica u obesidad.

Estos hallazgos nos permitieron identificar un polimorfismo (rs1800470, asociado con ECV y enfermedades renales) que tiene un efecto sobre la expresión del gen *TGF- β 1*. Posiblemente, la diferencia en expresión del gen *TGF- β 1* contribuya a una desregulación en algunas vías metabólicas relacionadas con la homeostasis de la glucosa, colesterol total, LDL o a la regulación de otros genes. Esto debe ser estudiado cuidadosamente en futuras investigaciones para entender los eventos celulares clave que contribuyen a esta desregulación.

5. INTRODUCCIÓN

La obesidad es el resultado del desequilibrio entre la energía consumida y la energía gastada por un individuo (1). Esta enfermedad genera cambios fisiológicos tales como: resistencia a la insulina; alteraciones en el metabolismo, estructura y actividad biológica de los lípidos (dislipidemia); hipertensión arterial y disfunción endotelial (2). Estas alteraciones pueden desencadenar la aparición de enfermedades graves como son DT2, problemas respiratorios, ciertos tipos de cáncer y ECV, tales como isquemia silente e infarto al miocardio (1,3,4).

La obesidad es un grave problema de salud pública a nivel mundial, especialmente en México que tiene el primer lugar en obesidad infantil (5). Al presentarse a edades tempranas, se espera que en pocos años aumente el número de casos de DT2 y ECV en adultos jóvenes. Las cuales son dos de las principales causas de muerte en México de personas adultas (6).

La obesidad, la DT2 y las ECV tienen orígenes multifactoriales con contribuciones ambientales y genéticas. Los alimentos ricos en carbohidratos y grasas saturadas, así como el sedentarismo, fumar y el estrés son algunos de los factores ambientales que predisponen a presentar obesidad (7). El desarrollo de obesidad también está relacionado con características genéticas, entre ellas, la expresión génica y los SNPs. Estudios genéticos puede ayudar a descubrir nuevos mecanismos moleculares y biológicos, permitiendo así entender mejor el papel de la obesidad en el desarrollo de enfermedades tales como DT2 (8,9).

La expresión génica puede ser alterada por variaciones genéticas conocidas como SNPs, por sus siglas en inglés. Estos cambios en la secuencia del DNA predisponen al desarrollo de enfermedades tales como: ECV, DT2, obesidad y cáncer, por mencionar algunas (10–12).

A partir de los estudios de asociación de todo el genoma (GWAS, por sus siglas en inglés) (13), se ha logrado identificar un gran número de SNPs asociados a diferentes enfermedades (14). Recientemente se han reportado GWAS donde se describen algunos SNPs que están relacionados a DT2 en población mexicana (11,15–18).

A pesar de que los GWAS son una herramienta muy útil en la búsqueda de SNPs, aún no existe una descripción detallada de las alteraciones que genera cada uno de los SNPs asociados, y de cómo propician el desarrollo de estas enfermedades (19).

Por esta razón uno de los objetivos de este trabajo fue determinar si la expresión de los genes: *TGF- β 1*, *IGF2PB2* y *SOD2* se modifica por el genotipo de los SNPs: rs1800470, rs4402960 y rs4880, implicados con DT2, enfermedades cardiovasculares, obesidad, nefropatía diabética, resistencia a la insulina y estrés oxidativo (20–25).

De igual manera se busca si la expresión de estos genes se asocia con los niveles de algunos parámetros bioquímicos (glucosa, colesterol total, triglicéridos, HDL, LDL e insulina) y antropométricos (diagnóstico de obesidad).

6. MARCO TEÓRICO

6.1. NOCIONES DE GENÉTICA

El genoma es una secuencia larga de DNA que contiene la información hereditaria presente en un organismo. En eucariontes, el genoma incluye al DNA cromosómico y al DNA mitocondrial (26). El DNA genómico humano se organiza en 22 pares de cromosomas y un par de cromosomas sexuales (XX o XY). Los cromosomas están formados por una molécula larga de DNA de doble cadena, que codifica para los genes (Figura 1) (26,27).

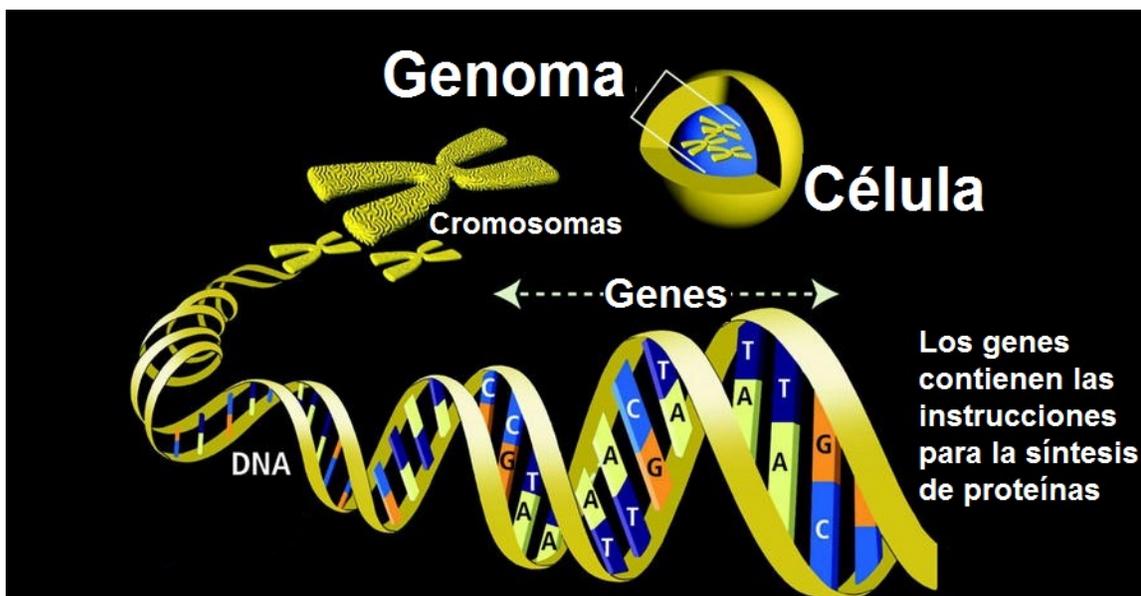


Figura 1. Esquema de algunos niveles de organización del genoma (28).

Los organismos diploides como los seres humanos, son aquellos que tienen dos conjuntos de cromosomas, por tanto se tienen dos formas alternativas de un gen llamadas alelos (26). Cuando se presentan alelos iguales se dice que el organismo es

homocigoto; mientras que, si tiene alelos diferentes el organismo será heterocigoto para el alelo de interés (26).

Los genes estructurales contienen la información para sintetizar un polipéptido específico. Sin embargo, este proceso se lleva a cabo a partir de un intermediario, el RNA mensajero (mRNA) (27). El mRNA se transloca al citoplasma donde es traducido por los ribosomas generando un polipéptido (Figura 2) (29).

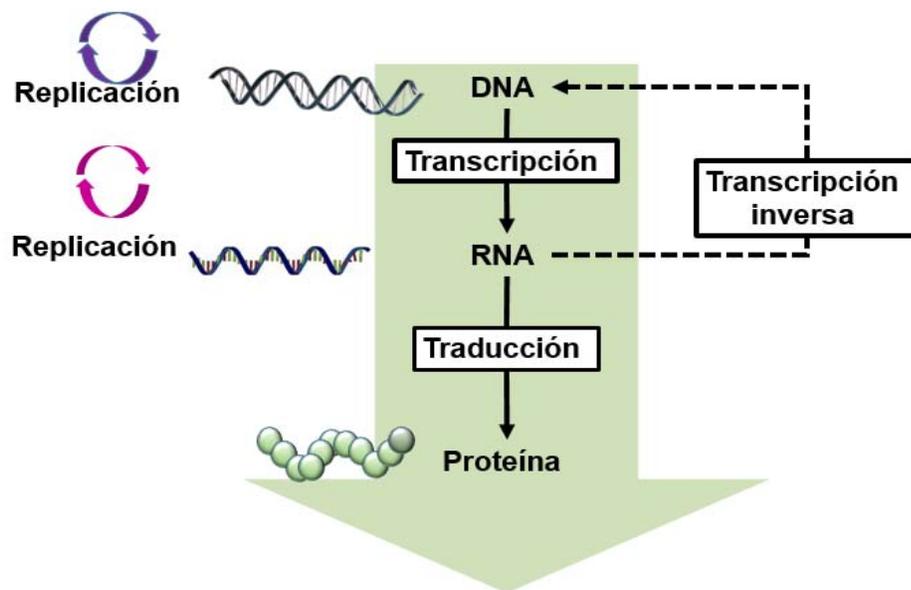


Figura 2. Dogma central de la biología molecular (26).

La transcripción de un gen se inicia con la apertura de la cromatina, para que esté dejen expuesta la secuencia del gen a transcribir. Durante la transcripción se requiere de una serie de secuencias específicas, proteínas (factores de transcripción y RNA polimerasa) que participan en la expresión génica (27). La RNA polimerasa II, es la enzima encargada de sintetizar mRNA y ciertos tipos de RNA pequeños (26).

Entre las secuencias específicas mencionadas anteriormente tenemos a los promotores, potenciadores y silenciadores (29). Los promotores son secuencias de DNA que comúnmente se localizan río arriba del sitio de inicio de la transcripción, es decir, se localizan, cerca de la posición en el DNA correspondiente a la primera base que se incorpora en el RNA (26). La RNA polimerasa II no puede identificar al promotor por sí sola, es aquí donde participan los factores de transcripción basales, estos son proteínas que identifican al promotor y crean un sitio diana para que la RNA polimerasa II se ensamble (30).

Los potenciadores por su parte, son secuencias de DNA que pueden estar localizados tanto río arriba como abajo del promotor. Los potenciadores aumentan la transcripción de los genes (19). Algunos potenciadores también utilizan factores de transcripción que interactúan con el promotor. Por último, los silenciadores son secuencias de DNA que inactivan la expresión de un gen vecino, y pueden localizarse en cualquier región del genoma (26).

Los factores de transcripción son proteínas que se unen a secuencias de DNA (29). La presencia de alguna variación en la secuencia de los potenciadores, promotores o silenciadores podría implicar que los factores de transcripción específicos a estas secuencias no se les unan, ocasionando una alteración en la expresión génica (19).

6.2. POLIMORFISMOS DE UN SÓLO NUCLEÓTIDO

Los SNPs se define como el cambio de una sola base en una secuencia específica del DNA y cuya frecuencia en la población es mayor al 1% (31). Los SNPs son los principales responsables de la diversidad genética entre individuos, además de jugar un papel importante en el desarrollo de varias enfermedades (31). Cabe aclarar que no son las únicas variaciones genéticas, también existen las variaciones en el número de copias (inserción, deleción, inversión etc) (32).

Aquellos SNP que tienen un papel importante en el desarrollo de enfermedades son conocidos como SNP funcionales y se clasifican en rSNP (reguladores), srSNP (RNA estructurales) y cSNP (codificantes) (31). En la Tabla 1 se presentan algunas características y efectos de los SNP.

Tabla 1. Clasificación de SNPs funcionales (31).

Tipo de SNP funcional	Características.	Efecto
rSNP	Se localiza en los promotores de los genes que sintetizan proteínas	Afectan la expresión génica
srSNP	Se encuentran en los mRNA primarios (con intrones) y secundarios (sin intrones), incluyendo regiones no codificantes (<i>UTR</i> , por sus siglas en ingles). No hay cambios de aminoácidos	Afecta la estructura y función de los mRNA, incluyendo corte y empalme, la regulación de la traducción de los mRNA a proteínas, la funcionalidad de proteínas y la estabilidad del mRNA, la poliadenilación de los mRNA
cSNP	Se encuentran en los exones Se subdivide en sinónimos y no sinónimos	Sinónimos: no cambia el aminoácido. No sinónimos: cambia el aminoácido.

Utilizando GWAS ha sido posible la asociación de SNPs y/o genes a diferentes patologías. Los SNPs pueden localizarse dentro del gen (exones e intrones) o en regiones no codificantes y promotoras. Dependiendo de su localización los SNPs pueden tener diferentes efectos sobre la expresión génica. Esto puede generarse por varias vías, mediante la modificación, creación o eliminación de secuencias (promotores, potenciadores y silenciadores) necesarias para la unión y reconocimiento de factores de transcripción (12). Los SNPs también pueden causar alteraciones en la estructura, función y estabilidad del mRNA, en el corte y empalme, la poliadenilación del RNA y la metilación del DNA (33). También pueden alterar la regulación traduccional; por ejemplo, si se encuentran en los exones pueden perturbar los codones que llevan un código específico para un aminoácido determinado, alterando en consecuencia la funcionalidad de las proteínas (12).

Generalmente el efecto de los SNPs sobre los procesos celulares no se conoce, por lo que la búsqueda de alteraciones causadas por estas variantes genéticas son importantes para entender mejor la patofisiología de la enfermedad (12,31). En la Tabla 2, se presentan algunos ejemplos de SNP implicados en varias enfermedades y como afectan la expresión del gen o bien su estabilidad.

No todos los SNPs asociados con cierta enfermedad son los SNPs efectores. Es decir, es posible que en algunos casos la asociación polimorfismo-enfermedad sea el resultado de variantes que están en desequilibrio de ligamiento. Algunas veces durante la recombinación genética, ciertas variantes tienden a heredarse juntas, a esto se le llama desequilibrio de ligamiento.

Tabla 2. Ejemplo de SNPs asociados a diversas enfermedades.

Gen y SNP	Localización	Alelo u haplotipo	Efecto funcional	Patología asociada
<i>TNF-α</i> -169T/C	Promotor	C	Crea una mayor afinidad de unión al factor de transcripción NF- κ B, conlleva a una sobre expresión del gen.	Tiroiditis autoinmune (34).
<i>TNFR2</i> 593A/G, 598T/G y 620 T/C	3' UTR	ATC	Aumenta la degradación del mRNA del gen <i>TNFR2</i> .	Obesidad (35,36).
<i>DRD2</i> 957T/C	Exón	T	Modula la estabilidad del mRNA del gen <i>DRD2</i> .	Esquizofrenia (37).

6.3 OBESIDAD

6.3.1 LA OBESIDAD INFANTIL EN MÉXICO

La obesidad es un problema mundial de gran interés, principalmente porque la población que presenta esta enfermedad no solo se compone de adultos sino que afecta en buena medida a la población infantil. De acuerdo a los reportes de la Organización Mundial de la Salud (OMS), más del 30 % de los niños en el norte de América tienen sobrepeso u obesidad, y más del 80 % de los niños con sobrepeso u obesidad a nivel mundial se encuentran en países en vías de desarrollo (38). Actualmente en México se tiene la prevalencia más alta de obesidad infantil en el mundo (3, 28).

Según ENSANUT 2012, el 34.4 % de niños y 35 % de adolescentes en México padecen sobrepeso u obesidad (6). Este hecho es preocupante debido a que estos niños tienden a seguir siendo obesos en la adultez y además tienen un mayor riesgo

a desarrollar síndrome metabólico, DT2 y enfermedades cardiovasculares (5,39,40). Se dice que para el 2050, en México habrá más personas obesas y con sobrepeso que personas con peso normal y cerca de 12 millones de diabéticos y 8 millones de casos con enfermedades cardiovasculares (41). Por estas razones se entiende que no solo la salud de los mexicanos se verá afectada, sino que también se espera una pérdida de productividad acompañada por muertes a edades tempranas (42). Estudios relacionados con la población infantil mexicana han identificado que estos presentan niveles altos de alanina aminotransferasa (ALT), un marcador para el hígado graso no alcohólico (HGNA). Esto indica un aumento en el riesgo de desarrollar HGNA en la adultez, además de que sugiere un mayor riesgo a desarrollar DT2 (43).

6.3.2 FACTORES AMBIENTALES Y GENÉTICOS

La obesidad es el resultado del desequilibrio entre la energía que se consume y la energía que se gasta (1). Existen factores tanto ambientales como genéticos que propician esta enfermedad (44,45). Entre los principales factores de riesgo ambientales, tenemos el consumo de alimentos ricos en grasas y carbohidratos que aportan grandes cantidades de energía, y el sedentarismo que promueve la acumulación del exceso de energía consumida en forma de grasa. El fumar, un bajo nivel socioeconómico y el estrés son otros factores ambientales que también contribuyen al desarrollo de la obesidad (7).

En cuanto a los factores genéticos, existen genes que juegan un papel importante en la susceptibilidad a la obesidad. En algunos casos la asociación obesidad-gen ha sido

posible a través de estudios de asociación con SNPs, como ejemplo de ello tenemos a los genes *FTO* (*rs9939609*), *MC4R* (*rs17782313*) y *KCTD15* (*rs11084753*) que se relacionan con el aumento del IMC (44). Algunos trabajos han indagado más allá de la asociación de SNPs con enfermedades, encontrando interesantes descubrimientos como en el caso del gen *FTO*, que al sobre expresarse altera varios genes relacionados con el procesamiento del mRNA y al disminuir su expresión altera la transcripción de genes implicados con la inanición (46).

Así, la implicación de varios genes y sus SNPs, junto con los factores ambientales incrementa uno a uno el riesgo a presentar enfermedades como la obesidad, DT2 o ECV. Esto se ve representado en la Figura 3.

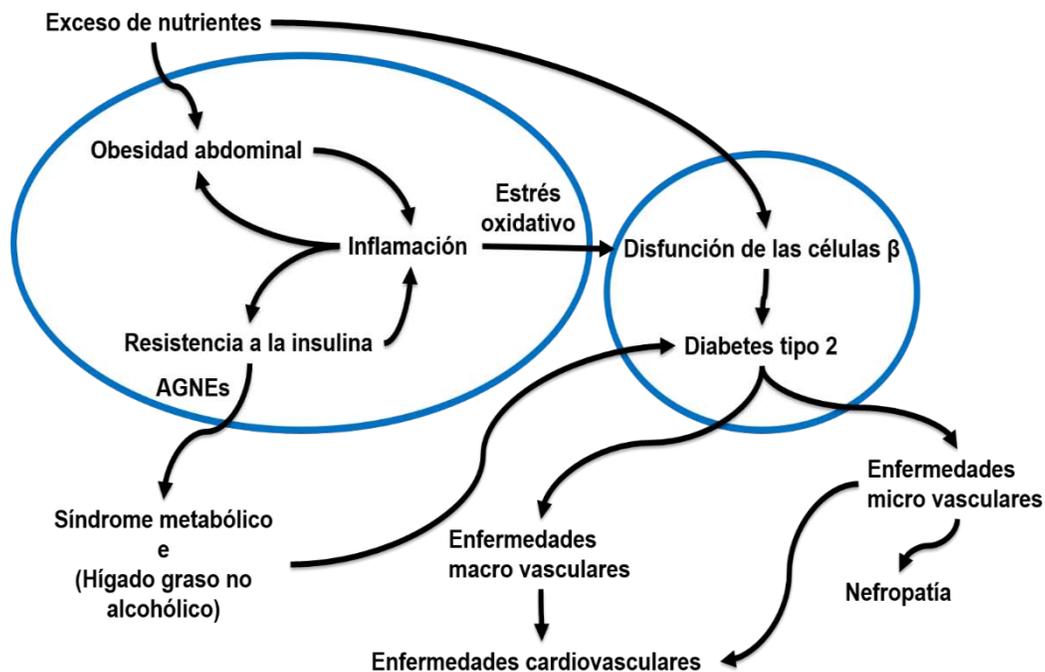


Figura 3. La obesidad; su asociación con DT2 y sus comorbilidades (3).

6.3.3 INFLAMACIÓN DE BAJO GRADO EN LA OBESIDAD

El exceso de energía ingerida normalmente se almacena en forma de grasa en los depósitos de tejido adiposo; específicamente dentro de los adipocitos los cuales funcionan como reservorios de energía. Durante la obesidad, demasiados ácidos grasos no esterificados (AGNEs), ocasionan que los adipocitos aumenten en tamaño (hipertrofia) y en número (hiperplasia). Al acelerarse el crecimiento del tejido graso, se rebasa la velocidad de angiogénesis, generando un estado de hipoxia, que puede propiciar la necrosis de los adipocitos, induciendo la disfunción del tejido graso (47,48). Se sabe que en estas condiciones los adipocitos secretan citosinas pro-inflamatorias como el factor de necrosis tumoral alfa (TNF- α), el cual provoca que los pre-adipocitos y las células endoteliales produzcan una proteína de quimioatrayente de monocitos (MCP-1), y a una proteína llamada ligando 5 de quimosina (CXCL5), la cual es un quimioatrayente de macrófagos. De esta manera se facilita el reclutamiento de macrófagos, principalmente del tipo M1 o proinflamatorios (3,49). Los macrófagos infiltrados en el tejido adiposo producen más citosinas proinflamatorias contribuyendo aún más a la inflamación (40).

La inflamación de bajo grado que se presenta durante la obesidad es la llave en el desarrollo de otras enfermedades como por ejemplo la esteatosis en el hígado, causada por los ácidos grasos no esterificados (AGNEs) elevados. La esteatosis puede evolucionar a esteatohepatitis, fibrosis y finalmente a cirrosis. Estas son las fases del conocido hígado graso no alcohólico (HGNA) que es la principal complicación del síndrome metabólico (SM), el cual se revisará con mayor detalle en el capítulo 6.4.

Las citosinas proinflamatorias TNF- α , IL-6 y los AGNEs, se han asociado con el desarrollo de resistencia a la insulina (RI), que juega un papel importante en la aparición de varias enfermedades, principalmente DT2, este tema se verá con mayor detalle en el capítulo 6.5.1 (40,50).

6.4 SÍNDROME METABÓLICO

El síndrome metabólico, es una combinación peligrosa de síntomas de enfermedades que en adultos se diagnostica cuando se presenta la obesidad abdominal, definida por la circunferencia de la cintura (≥ 90 cm para hombres y ≥ 80 cm en mujeres) y alteraciones en dos de los siguientes parámetros: hipertensión arterial ($\geq 130/ >85$ mmHg), triglicéridos (≥ 150 mg/dL), HDL (en hombres < 40 mg/dL y en mujeres < 50 mg/dL) y glucosa en ayuno (≥ 110 mg/dL) (51,52). Un metanálisis realizado con 37 estudios longitudinales mostró que los individuos que presentan SM tienen un riesgo del 78% a sufrir accidentes cardiovasculares y muerte (53). Asimismo, otro estudio demostró que el riesgo de desarrollar DT2 aumenta hasta en un 52 % en individuos que presentan obesidad o síndrome metabólico, (54).

Se ha descrito que los niños con obesidad tiene un riesgo tres veces mayor de desarrollar hipertensión, además de que presentan una mayor prevalencia de dislipidemia, la cual se manifiesta como un aumento de triglicéridos, LDL, bajos niveles de HDL, y cierto grado de resistencia a la insulina (55). Por tales motivos las alteraciones del SM que aparecen progresivamente a lo largo de los años, pueden presentarse prematuramente (44).

Establecer un perfil de diagnóstico para síndrome metabólico en niños, es bastante difícil puesto que los parámetros bioquímicos (triglicéridos, HDL, glucosa) y antropométricos (IMC, talla, peso, circunferencia de la cintura) a diferencia de los adultos varían, debido a su género y a su crecimiento constante. En la literatura se han propuesto diferentes criterios para su diagnóstico, entre ellos se encuentran los criterios de Ferranti *et al.* (56), Cook *et al.* (57), Weiss *et al.* (58) y los de la Federación Internacional de Diabetes o IDF por sus siglas en inglés (59). Estos tienen en común algunos criterios de ciertos parámetros (presión arterial, niveles de HDL y triglicéridos) pero difieren en otros, como en los niveles de glucosa. Además de que algunos utilizan la circunferencia de la cintura y otros el IMC para definir la obesidad abdominal. Sin embargo, el criterio más utilizado es el de Ferranti *et al.* (56), el cual se presenta en la Tabla 3.

Tabla 3. Criterios de Ferranti *et al.* (56), para el diagnóstico de SM en población infantil necesitan cumplirse 3 o más factores.

Factor	Criterio
Circunferencia de la cintura[~]	> al percentil 75
Glucosa en ayuno (mg/dL)	≥ 110
Presión arterial[*]	> al percentil 90
HDL (mg/dL)	< 50 en niñas < 45 en niños
Triglicéridos (mg/dL)	≥ 100

[~]Ajustado por edad y género, ^{*} ajustado por género, edad y peso.

6.5 LA OBESIDAD Y SUS COMPLICACIONES

6.5.1 LA DIABETES TIPO 2

La DT2 se caracteriza por dos sucesos principales, el primero es conocido como resistencia a la insulina (IR) y el segundo es el daño a las células β del páncreas. Durante la IR la señalización de la insulina no ocurre adecuadamente, lo que ocasiona que aumente la demanda de esta última por parte de los tejidos, y esto a su vez induce un aumento en la producción de esta hormona en las células β . Con el tiempo, la inflamación crónica daña estas células β , bajando la producción de insulina y por lo tanto no se logra cubrir su demanda. La consecuencia, es un aumento de los niveles de glucosa en sangre (hiperglicemia), si ambos sucesos se prolongan se presenta la DT2 (3).

6.5.1.1 RESISTENCIA A LA INSULINA

Se sabe que durante la inflamación crónica TNF- α e IL-6 pueden inducir directamente la IR, a través de una retroalimentación negativa de la señalización de la insulina (60). En este mecanismo TNF- α , IL-6 y los AGNEs afectan la fosforilación y degradación de residuos del sustrato del receptor de insulina (IRS), además de que disocia la unión receptor-IRS (60–65). Esto a través de moléculas intermediarias que promueven la interrupción de la señalización de la insulina e indirectamente generan hiperglicemia (61). Los IRS son extremadamente importantes en la señalización de la

insulina, ya que son las primeras moléculas en fosforilarse. La unión insulina-receptor de insulina-IRS, inician una cascada de señalización que promueve la movilización de GLUT-4 (transportadores de glucosa) desde el interior celular a la membrana celular, permitiendo la entrada de glucosa (66).

6.5.1.2. EL ESTRÉS OXIDATIVO EN DESARROLLO DE DT2

La célula utiliza como principal fuente de energía a la glucosa y a los ácidos grasos. Ambos tipos de moléculas son oxidadas en la mitocondria, para obtener adenosin trifosfato (ATP), que es una molécula de alta energía utilizada por la célula para sus diferentes procesos metabólicos. Sin embargo, durante el proceso de oxidación, también se generan especies reactivas de oxígeno (ROS). Ejemplo de ellos son el anión superóxido (O_2^-), el radical hidroxilo (OH^\cdot) y el peróxido de hidrógeno (H_2O_2). Estas moléculas son muy inestables con una potente capacidad oxidante, que dañan a las proteínas, DNA y lípidos, alterando así muchas funciones metabólicas, lo que se conoce como estrés oxidativo (67). Para combatir los efectos dañinos de estas moléculas, la célula tiene cinco niveles de protección con capacidad antioxidante que se llevan a cabo en mayor medida dentro de la mitocondria. Como primera línea de defensa, tenemos el sistema citocromo oxidasa, un sistema enzimático que se ocupa del 90% de la reducción del oxígeno en el ser humano, el segundo nivel cuenta con la superóxido dismutasa mitocondrial, llamada también SOD2, que cataliza la conversión del anión superóxido en peróxido de hidrógeno y oxígeno. En el tercer nivel tenemos otras enzimas como la catalasa y la glutatión peroxidasa que convierten

el H₂O₂ en agua. El cuarto nivel lo componen compuestos, tales como la vitamina E que tienen propiedades antioxidantes. Por último, el quinto nivel es la regeneración celular (68–70).

Durante el desarrollo de DT2 existe una exposición prolongada de los tejidos a niveles elevados de glucosa. La glucotoxicidad resultante causa un daño irreversible en los tejidos debido principalmente a la generación de los ROS (71). Este proceso es particularmente dañino para las células β (72), cuando el exceso de ROS sobrepasa la capacidad antioxidante de los diferentes niveles (71). La glucotoxicidad no sólo puede generar daño por medio del estrés oxidativo, de acuerdo con Maedler *et al.*, la IL-1 β (una citosina secretada por las células β) puede aumentar la apoptosis de estas células en presencia de una hiperglicemia prolongada (73).

Por su parte la lipotoxicidad es la inhibición de la secreción de la insulina debido al aumento de AGNEs (productos de la degradación de triglicéridos). En la DT2, al no poder metabolizarse la glucosa, el metabolismo utiliza como fuente secundaria de energía a los lípidos. La lipotoxicidad puede utilizar un mecanismo similar a la glucotoxicidad para generar ROS y producir daño en las células β (74).

6.5.2 ENFERMEDADES CARDIOVASCULARES

La dislipidemia, la obesidad y la DT2 son los principales factores de riesgo para desarrollar ECV. Estas enfermedades generan lesiones vasculares por diferentes mecanismos que aún no han sido completamente dilucidados (75). Las lesiones vasculares con el tiempo generan disfunción endotelial, la cual es caracterizada por un

desequilibrio entre agentes vasoconstrictores y vasodilatadores (75,76). Entre los principales agentes vasodilatadores tenemos al óxido nítrico y la bradicinina, y como agentes vasoconstrictores encontramos a la endotelina-1 y la angiotensina II (75).

El engrosamiento de la íntima (capa interna de los vasos sanguíneos) es generado por la oxidación de las moléculas de LDL por los ROS (75). Durante la obesidad factores como el aumento de TNF- α y los triglicéridos favorece la generación de anión superóxido (77). Los ROS inactivan al óxido nítrico y propician que las células endoteliales expresen receptores de LDL, los cuales permiten transportar moléculas de LDL oxidadas (LDLox) y células apoptóticas a la íntima (75). Las moléculas de LDLox generan apoptosis de células endoteliales y la expresión de moléculas de adhesión (ICAM-1, VCAM-1, P-selectina, E-selectina y MCP-1) que permiten la migración de monocitos al sitio de la lesión y la transformación de estos a macrófagos, los cuales al fagocitar moléculas LDLox se convierten en células espumosas (75,76). Las células espumosas reclutan linfocitos T, que secretan TNF- α , el cual potencia la expresión del receptor de LDL, lo que ocasiona la migración de un mayor número de monocitos, aumentando así el grado de inflamación (76). La inflamación crónica y la acumulación de lípidos en la íntima generan el crecimiento de lo que se conoce como capa ateromatosa (75). Las placas ateromatosas son un conjunto de células del músculo liso, colágeno y células espumosas que pueden aumentar de tamaño, disminuyendo la luz de las arterias y venas, alterando así el flujo sanguíneo (75). Las placas ateromatosas tienden a debilitarse y romperse generando un coágulo que da origen a eventos cardiovasculares y cerebrovasculares agudos (75).

Los depósitos de grasa se dividen en: subcutáneos que constituyen entre el 70-80% de la grasa total del cuerpo, grasa visceral constituida por el 10-15% y por último

tenemos a la grasa ectópica, que se encuentra en menor proporción que las dos primeras. La grasa ectópica incluye grasa epicardial, pericardial y perivascular, es decir, el tejido adiposo que rodea la superficie del corazón y aquella que envuelve los vasos, arterias y venas (3).

El exceso de energía se almacena inicialmente en la grasa no ectópica, principalmente en depósitos subcutáneos, pero al rebasar la capacidad de almacenaje de este tejido, la energía comienza a acumularse en depósitos ectópicos. La cercanía de la grasa ectópica con el sistema circulatorio y la secreción de citosinas proinflamatorias por parte del tejido graso pueden generar un daño vascular local, contribuyendo a la formación de la placa ateromatosa y al desarrollo de las ECV (78).

6.5.2.1. ISQUEMIA SILENTE E INFARTO AL MIOCARDIO

La isquemia silente es el aporte ineficiente de sangre y oxígeno al músculo cardiaco, se genera cuando una arteria se estrecha o se obstruye momentáneamente, impidiendo así la oxigenación del corazón, si se presenta de manera prolongada, puede dar lugar a un infarto al miocardio y a la muerte del tejido cardiaco (4). Comúnmente la interrupción momentánea del flujo sanguíneo ocasiona dolor (angina de pecho). Los pacientes que lo experimentan tienen una sensación de asfixia, presión u ardor en el pecho (79). La isquemia silente se denomina así debido a que no causa dolor. Los pacientes diabéticos, son muy susceptibles a esta complicación (4).

6.6 GEN *TGF-β1*

TGF-β (*transforming growth factor beta*) es una subfamilia de proteínas, que está compuesta por: *TGF-β1*, *TGF-β2* y *TGF-β3* (80), donde *TGF-β1* es la proteína más representativa de esta subfamilia, y se encuentra presente en células endoteliales, vasculares, miofibroblastos, macrófagos y otras células hematopoyéticas (80,81).

TGF-β1 es secretada en la matriz extracelular como una proteína inactiva. Su activación esta mediada por trombospodina-1, plasmina, metaloproteinasas de matriz e integrina $\beta 6$ (81–83). Hay evidencia de que *TGF-β1* activada está asociada al desarrollo de enfermedades cardiovasculares, como hipertensión (84), hipertrofia cardiaca (85) y fibrosis cardiaca (86). Se ha demostrado que angiotensina II (un potente vasoconstrictor, que aumenta la presión arterial) potencia la expresión génica del mRNA de *TGF-β1* en células epiteliales, por medio de la regulación transcripcional y postranscripcional (87,88). En ratones transgénicos la sobreexpresión de *TGF-β1* resulto en hipertrofia cardiaca, caracterizada por fibrosis intersticial e hipertrofia de los cardiomicotos (89). *TGF-β1* también se ha asociado a nefropatía diabética (90), y se ha encontrado que los niveles altos de *TGF-β1* confieren riesgo en la progresión de enfermedades renales en humanos (91).

La nefropatía diabética es una complicación de DT1 y DT2, puede definirse como la presencia de albuminuria (> 300 mg/24 hs o > 200 $\mu\text{g}/\text{min}$) en un paciente diabético, que no tenga antecedentes de enfermedad renal o del tracto urinario. La hiperglicemia, presente en diabetes, puede desencadenar la producción de ROS, que favorece el

daño y la fibrosis de este tejido. La nefropatía diabética evoluciona progresivamente a insuficiencia renal (22).

Por otro lado, un estudio reciente demostró una posible interacción entre TGF- β 1 y la obesidad visceral, debido a que se asoció a un IMC elevado, y a la obesidad abdominal en población sueca (21)

En este trabajo nos enfocamos en estudiar al rs1800470, localizado en el primer exón del gen *TGF- β 1*. Este SNP induce un cambio de base de prolina (alelo C) a leucina (alelo T). En varones japoneses, el alelo T del rs1800470 se asoció a infarto al miocardio; y en mujeres con genotipo CC se encontraron niveles elevados de la proteína TGF- β 1 en el suero (92). Otro estudio, realizado por Chen *et al.* (20) menciona que el genotipo TC junto con el hábito de fumar, incrementan el riesgo a desarrollar enfermedades isquémicas cardíacas e infarto al miocardio. En mexicanos el genotipo TT incrementa 2.5 veces el riesgo de desarrollar síndrome coronario agudo (93).

El rs1800469 localizado en la región promotora del gen *TGF- β 1* (94), se encuentran en un desequilibrio de ligamiento moderado ($D' > 0.79$) con el rs1800470 en población mexicana (95). El alelo T del rs1800469 crea un sitio de enlace para YY1 (un factor de transcripción) en el potenciador del gen *TGF- β 1*, ocasionando un aumento en la expresión en este gen, dicho alelo se ha asociado a altos niveles de TGF- β 1 en circulación (95,96).

Se ha descubierto que los haplotipos CC y TT de los SNPs rs1800470 y rs1800469 son de protección para isquemia silente en pacientes diabéticos, mientras que el haplotipo TC es de riesgo (95). Por otro lado, el haplotipo TT se presentó en

mexicanos como de riesgo para síndrome cardiaco agudo, mientras que el haplotipo CC se asoció a la disminución en su incidencia (93). En población italiana se ha descubierto que el haplotipo TC de los mismos SNPs (rs1800469 y rs1800470) aumenta el riesgo para presentar infartos al miocardio (94). Aunque existen algunas discrepancias entre la asociación de estos SNP, es claro que juegan un papel importante en el desarrollo de enfermedades cardiovasculares.

6.7 GEN IGF2BP2

IGF2BPs (*insulin-like growth factor 2 mRNA binding proteins*) es una familia de proteínas, que está compuesta por IGF2BP1, IGF2BP2 e IGF2BP3. En embriones de invertebrados y anfibios, esta familia está relacionada con la localización, estabilidad y traducción del mRNA (97). Se sabe que las IGF2BPs en humanos, se enlazan al mRNA del factor de crecimiento similar a la insulina dos (*IGF2*) (97). *IGF2* está bastante expresado en la etapa fetal y juega un papel importante en el crecimiento y desarrollo de los órganos, incluyendo la adipogénesis (98).

En ratones los tres tipos de IGF2BPs se expresan en la etapa embrionaria, y su expresión declina a medida que el embrión se desarrolla, en animales adultos la expresión es baja o indetectable (97). En humanos la IGF2BP2 se ha encontrado expresada en tejido adiposo, páncreas y sangre de pacientes con DT2 (99–101).

IGF2BP2 se encuentra principalmente en el citoplasma, pero en respuesta a señales nucleares de exportación, puede dirigirse al núcleo y unirse a su mRNA objetivo,

permitiendo la exportación nuclear de los transcritos para propiciar la síntesis de proteínas en lugares específicos del citoplasma (102).

Debido a que los miembros de la IGF2BPs tienen una similitud entre sí del 59%, se cree que la sobreexpresión de *IGF2BP2* puede generar un daño morfológico en el páncreas ya que esto se ha encontrado con *IGF2BP3* (23).

Xia Li *et al.* (103), descubrieron dos isoformas de IGF2BP2 en humanos. Asimismo Chistiakov *et al.* (23), corroboraron este hallazgo, y nombraron a las isoformas p66 y p58, cuyos nombres se refieren al número de aminoácidos que tiene cada una.

La isoforma corta (p58) carece de un sitios de unión al mRNA, por lo que se sospecha que se une al mRNA del gen IGF2 de forma ineficiente y por tanto no suprime la expresión del mismo gen como lo haría la isoforma p66 (23,104). Se ha demostrado que al inhibir IGF2 en el páncreas de embriones de ratas que presentan espontáneamente DT2, hay una disminución en la masa de las células β , dando como consecuencia hiperglicemia (105).

Chistiakov *et al.* proponen que la unión IGF2BP2- mRNA IGF2 disminuye la transcripción de IGF2, sugiriendo que p66 puede predisponer el desarrollo de IR, ya que se encontraron niveles bajos de p58 y niveles altos de p66 en el tejido adiposo de pacientes diabéticos (23).

El gen que codifica para IGF2BP2 se localiza en el cromosoma 3q27.2 (106), y se ha asociado con DT2 en varias poblaciones, incluyendo a la población mexicana. Sin embargo, también se ha relacionado con esquizofrenia y cáncer (107–110).

El rs4402960 (G/T), que se estudia en este trabajo, se encuentra en el intrón más grande con el que cuenta el gen. *IGF2BP2* se ha implicado con DT2 en población mexicana (110), europea y asiática (111), donde T es el alelo de riesgo. Los individuos rusos con DT2 y sin ella, que tenían el genotipo TT, desarrollaron niveles elevados de HOMA- IR, un índice que determina el grado de IR (23).

Aunque se ha asociado el rs4402960 con DT2, no se conoce la manera en la que este favorece la enfermedad. No obstante, el papel de este SNP con DT2 es reforzado con la identificación de otro SNP (rs11701705) relacionado con IR y que está en desequilibrio de ligamiento con el rs4402960 estudiado en población México-americana. (103). El rs11701705 (C/T) se encuentra en la región promotora del gen *IGF2BP2*, por lo que se cree altera la unión de factores de transcripción al mRNA, afectando la expresión de este gen (103).

En sujetos diabéticos y no diabéticos con genotipo AA del rs11701705, se encontraron niveles elevados de la isoforma de la proteína IGF2BP2 (p66) que se cree, se une de forma más eficiente a su objetivo, disminuyendo la expresión de *IGF2* y causando un pobre desarrollo de las células beta, produciendo en consecuencia resistencia a la insulina e hiperglicemia, dos de las principales características de DT2 (23).

6.8 GEN SOD2

SOD2 es una proteína que pertenece a la familia de las superóxido dismutasas (SODs) que son la primera y más importante línea de defensa antioxidante que

protege contra los ROS y particularmente de los aniones superóxido (112). SOD2 se encuentra principalmente en las mitocondrias (113). Se ha confirmado que SOD2 juega un papel importante en la diferenciación celular y la tumorigénesis (114). SOD2 tiene una estructura y secuencia conservada en varias especies, tales como; humano, ratón y rata (115–118), además se ha demostrado que en la región promotora del gen de *SOD2* hay múltiples copias de secuencias consenso para los siguientes factores de transcripción Sp-1(promueve la transcripción) y AP2 (reprime la actividad promotora) en humano, murino, especies bovinas y en rata (112). Por otro lado, en un modelo animal la completa inhibición del gen de *SOD2* resulto letal (119), lo que demuestra la gran importancia de este gen (120). Se sabe que existe una variedad de componentes que promueven la transcripción de *SOD2*, tales como, citosinas (IL-1,IL-4,IL-6, TNF α , lipopolisacaridos y IFN- γ), factores de crecimiento derivados de plaquetas (112), esta última está asociada a la activación de un factor de transcripción conocido como Egr-1 en células de fibroblastos de embriones de ratón (121).

El rs4880, que se estudiará en este trabajo está localizado en un exón del gen *SOD2*, presenta un cambio de base de citocina (alanina), por una Timina (valina), asociada esta última con la presencia de micro albuminuria (predicador de nefropatía diabética) en pacientes con DT2 en población mexicana, japonesa, coreana y china (24,25). Se cree que la presencia del alelo T hace que la conformación de la proteína cambie, lo que induce una disminución de la actividad de *SOD2* en un 30-40%, propiciando de esta forma que el daño renal por parte del estrés oxidativo se incremente (24).

7. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

La obesidad es un problema de salud mundial que favorece el desarrollo de enfermedades como la DT2 y las enfermedades cardiovasculares. Hasta hace algunas décadas, la obesidad se presentaba principalmente en adultos. De acuerdo a estudios epidemiológicos su prevalencia en la población infantil ha aumentado, por lo que se estima que en los próximos años se observará una pérdida de productividad y muertes a edades tempranas asociadas con esta enfermedad (42). Hay evidencia de que la obesidad y la DT2 son enfermedades multifactoriales, en las que la genética de cada individuo puede contribuir a padecer esta enfermedad (3).

A partir de estudios GWAS se ha podido identificar un número importante de SNPs asociados a obesidad, enfermedades cardiovasculares, DT2 y las complicaciones de éste último, principalmente nefropatía y neuropatía. La asociación por sí sola, no explica cómo los mecanismos celulares se alteran por la presencia de las variantes, ni tampoco la manera en que se facilitan el desarrollo de estas patologías (19). El cambio en la expresión génica debido a la presencia de variantes asociadas es uno de los mecanismos que pueden estar modificados y explicar la susceptibilidad a desarrollar enfermedades multifactoriales como lo son la obesidad y la DT2 (8). Por tales motivos decidimos determinar, si existe alguna alteración en la expresión de los genes, *IGF2PB2*, *SOD2* y *TGF-β1*, implicados en la resistencia a la insulina, estrés oxidativo, enfermedades cardiovasculares y nefropatía diabética (23–25,89,90). Como resultado de las alteraciones en los niveles de algunos parámetros bioquímicos, antropométricos, así como la presencia de genotipos asociados con obesidad, DT2 y sus complicaciones.

8. HIPÓTESIS

La expresión génica de *TGF-β1*, *IGF2BP2* y *SOD2* se modifica como consecuencia de los genotipos de los polimorfismos rs1800470, rs4402960 y rs4880, de los niveles de algunos parámetros bioquímicos (glucosa, colesterol total, triglicéridos, HDL, LDL e insulina) y/o antropométricos (diagnóstico de obesidad)

9. OBJETIVOS

9.1.OBJETIVO GENERAL

- Determinar si la expresión génica de *TGF-β1*, *IGF2BP2* y *SOD2* es afectada por: el genotipo de los rs1800470, rs4402960 y rs4880, los parámetros bioquímicos glucosa, colesterol total, triglicéridos, HDL, LDL e insulina y/o antropométricos (diagnóstico de obesidad).

9.2.OBJETIVOS PARTICULARES

- Genotipificar 115 muestras de niños entre 6 a 14 años usando sondas Taqman específicas para los SNPs rs1800470, rs4402960 y rs4880.
- Determinar la expresión génica relativa de *TGF-β1*, *IGF2BP2* y *SOD2* mediante PCR tiempo real (qPCR) en muestras agrupadas por genotipo.
- Analizar los datos para identificar los parámetros bioquímicos, antropométricos o genéticos que modifican la expresión génica de *TGF-β1*, *IGF2BP2* y *SOD2*.

10. DISEÑO DE ESTUDIO

TIPO DE ESTUDIO

Analítico

Experimental

Transversal

Descriptivo

POBLACIÓN DE ESTUDIO

Población de niños y adolescentes de 6 a 14 años, que asistieron a la Unidad Deportiva Morelos de la Ciudad de México.

CRITERIOS DE INCLUSIÓN Y EXCLUSIÓN

Tabla 4. Criterios de inclusión y exclusión.

Criterios de inclusión	Criterios de Exclusión
Niños clínicamente sanos	Alguna enfermedad infecciosa aguda
Previo consentimiento y asentamiento informado por escrito	Que tengan alguna enfermedad crónica como alergias y enfermedades autoinmunes
Edades de 6 a 14 años	Que participen en un programa de reducción de peso, con o sin tratamiento farmacológico
Ambos sexos	
No emparentados	

La población estudiada consistió en 59 muestras de sujetos con peso normal y 56 muestras de sujetos con obesidad, clasificadas de acuerdo a las tablas de crecimiento

de *Centers for Disease Control and Prevention* (CDC) (122). En la Tabla 5 se presenta la clasificación.

Tabla 5. Percentiles para clasificar el peso de niños y adolescentes de acuerdo a la CDC (122).

Categoría de peso	Percentil de IMC ajustado por edad*
Bajo peso	< 5
Peso saludable	Entre 5 a < 85
Sobrepeso	Entre > 85 a <95
Obeso	≥ 95

* Ver las tablas de la CDC en el anexo 2.

VARIABLES

INDEPENDIENTE

- Genotipos de los SNPs rs1800470, rs4402960 y rs4880.
- Parámetros bioquímicos (glucosa, colesterol total, triglicéridos, HDL, LDL e insulina) y parámetros antropométricos (diagnóstico de obesidad)

DEPENDIENTE

- Expresión génica de *TGF-β1*, *IGF2BP2* y *SOD2*.

11. MATERIALES Y MÉTODOS

LUGAR DONDE SE REALIZÓ EL TRABAJO

El proyecto se realizó en la Unidad de Investigación Médica en Bioquímica que se localiza en el Hospital de Especialidades, Bernardo Sepúlveda, en el Centro Médico Nacional Siglo XXI del Instituto Mexicano del Seguro Social.

ORIGEN DE LA MUESTRA

Las muestras utilizadas, los datos antropométricos y bioquímicos se tomaron de la base de datos del proyecto de genética de la obesidad infantil y adolescente (GOIA) aprobado por la Comisión Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT), con clave de registro FIS/IMSS/PRI0/10/011 (123).

11.1. DATOS ANTROPOMÉTRICOS Y BIOQUÍMICOS

De la base de datos del proyecto GOIA (123) se seleccionaron 115 muestras que cumplieron con los criterios de inclusión. La glucosa, colesterol total, triglicéridos, HDL y LDL fueron medidos después de 12 hrs de ayuno, en sangre periférica, usando ILab 300. El cual cuantifica dichos metabolitos haciéndolos reaccionar con reactivos para generar un compuesto colorido, cuya intensidad de color es proporcional a la cantidad

* En esta sección se describe la metodología que el personal del proyecto GOIA siguió para medir los parámetros bioquímicos y antropométricos utilizados para este estudio.

de analito (glucosa, triglicéridos, colesterol, etc.) presente en la muestra. La insulina fue determinada por medio de inmunoanálisis quimioluminiscente inmunométrico, a partir de suero, su principio es similar al ensayo de inmunoabsorción ligado a enzimas (ELISA)*. En cuanto a los datos antropométricos, la edad y el sexo se obtuvieron de cuestionarios aplicados a los niños; el peso, fue medido con una balanza digital de marca Seca; la estatura, con un estadiómetro Seca 225; y la circunferencia de la cintura, con una cinta métrica también de marca Seca. El IMC, se calculó utilizando, el sexo, la edad, el peso y la estatura; y se utilizó para diagnosticar obesidad, de acuerdo con las tablas de la CDC (122); En la Tabla 6 se presentan los datos antropométricos y bioquímicos empleados en este estudio.

Tabla 6. Parámetros utilizados de la base de datos del proyecto GOIA.

Parámetros antropométricos	Parámetros Bioquímicos
Sexo	Glucosa
Edad	Colesterol total
Peso	Triglicéridos
Estatura	HDL
IMC	LDL
Circunferencia de la cintura	Insulina

11.2. ELECCIÓN DE SNPs EN POSIBLES SITIOS REGULADORES DE LA TRANSCRIPCIÓN

Se realizó una búsqueda en el sitio *The National Center for Biotechnology Information* (NCBI) para buscar bibliografía que reportara genes y SNPs asociados en mexicanos

a DT2 y sus complicaciones. Dichos SNPs fueron sometidos a una segunda selección por medio de un análisis in silico con los software: Pupasuite (124) , F-SNP (125), is-rSNP (126) y Haploreg V2 (127). Estos softwares nos permitieron elegir aquellos SNPs que pudieran encontrarse con mayor probabilidad en potenciadores, silenciadores y regiones promotoras. Estos elementos juegan un papel importante en la regulación de la transcripción. Los SNPs elegidos fueron los siguientes SNP: rs1800470 (*TGF-β1*), rs4402960 (*IGF2BP2*), y rs4880 (*SOD2*), ver Tabla 7.

Tabla 7. SNPs en posibles regiones reguladoras de la transcripción de acuerdo al análisis de Pupasuite, F-SNP, is-rSNP y Haploreg v2.

Software SNP	Pupasuite (124)	F-SNP e is-rSNP (125,126)	Haploreg v2 (127)
rs1800470 (<i>TGF-β1</i>)	Región conservada	Sitios reguladores de la transcripción	Región conservada y altera sitios de enlace a proteínas
rs4402960 (<i>IGF2BP2</i>)	NA*	Regulación transcripcional	Altera sitios de enlace a proteínas
rs4880 (<i>SOD2</i>)	Región conservada	Altera el corte y empalme	Altera sitios de enlace a proteínas y sitios reguladores de la apertura de la cromatina

*NA: no hay datos disponibles.

* En esta sección se describe la metodología para la extracción de DNA utilizada por el personal encargado de desarrollar GOIA

11.3. EXTRACCIÓN DE DNA

La extracción de DNA* se llevó a cabo en el equipo automatizado “AutoGenFlex STAR”, utilizando 5 mL de sangre periférica recolectada en tubos Vacutainer con EDTA.

La extracción de DNA inicia agregando un buffer de lisis que rompe las membranas celulares, dejando libre los núcleos y las mitocondrias, posteriormente la mezcla es centrifugada, lo que permite obtener una pastilla con dichos organelos. La pastilla es re-suspendida e incubada en un buffer desnaturizante, que contiene sales caotrópicas (hidrocloruro de guanidina) y proteasa para eliminar contaminantes como proteínas. El DNA total se precipita con isopropanol, y posteriormente se centrifuga la muestra para recuperar el DNA. Para eliminar restos de proteasa, e hidrocloreuro de guanidina, la pastilla es lavada con etanol al 70 %, se deja secar y se resuspende con un buffer de hidratación (Tris-Cl 10 mM, pH= 8.5).

11.4. GENOTIPIFICACIÓN

Se realizó la genotipificación de las 115 muestras mediante sondas Taqman específicas para los SNPs: rs1800470, rs4402960 y rs4880 (ver anexo 2 para la descripción de la técnica). Se utilizó el equipo 7900HT (*Applied Biosystems*®) y los software SDS 2.4 y Genotyper 2.5 (ambos de *Applied Biosystems*®) para la visualización de los datos.

En una placa de 364 pozos se colocaron las 115 muestras y dos controles negativos. En cada pozo se adicionó 2.5 µL de DNA (50 ng), 3 µL de Taqman *Genotyping Master Mix* II con N-uracil glicosidasa (UNG) 2X y 0.25 µL de sonda Taqman 20X específica para el SNP de interés (ambos reactivos de *Life technologies*®), ver Tabla 8. Para los controles negativos, se utilizó la misma mezcla a excepción del DNA que se substituyó por agua libre de DNAasas.

Tabla 8. Polimorfismos de un solo nucleótido estudiados en este trabajo.

Nombre del gen	SNP	Cambio de base	Código de sonda
TGFB1	rs1800470	C/T	C_22272997_10
IGF2BP2	rs4402960	G/T	C_2165199_10
SOD2	rs4880	C/T	C_8709053_10

Una vez cargada la placa con todas las muestras y los controles negativos se procedió a realizar la genotipificación por medio de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR), de acuerdo a las especificaciones dadas por el proveedor, *Applied Biosystems*. (128). El equipo fue programado con las condiciones de temperatura mostradas en la Tabla 9.

Tabla 9. Condiciones de PCR (128).

Pasos	Temperatura (°C)	Tiempo (segundos)	Ciclos
Incubación de la UNG	50	120	1
Activación de la polimerasa	95	600	1
Desnaturalización	95	15	45
Alineamiento/ extensión.	60	60	

11.5. EXTRACCIÓN DE RNA TOTAL

La extracción de RNA se llevó a cabo a partir de 150 μ L de sangre periférica, utilizando Tripure (Roche™). El método de extracción se basa en el uso del agente caotrópico, hidroclorehidrato de guanidinio, el cual desestabiliza diferentes tipos de enlaces químicos (puentes de hidrógeno y las fuerzas de Van der Waals), destruyendo las membranas celulares. El Tripure también inhibe la actividad de las nucleasas.

Se describirá brevemente el procedimiento para la extracción de RNA total, se mezclaron 150 μ L de sangre periférica, 150 μ L de agua libre de DNAsas y RNAsas y 3 mL de Tripure; se homogeneizó; y se incubó por 15 minutos a temperatura ambiente. Posteriormente se agregó cloroformo; se centrifugo a 12,000 rpm; la fase acuosa se colocó en un tubo nuevo; y se centrifugó a 12,000 rpm. Para eliminar restos de DNA se realizaron dos lavados con Tripure, los cuales consistieron en resuspender la pastilla en agua libre de nucleasas y adicionar 1 mL de Tripure, obtener la fase acuosa y precipitar con Isopropanol. Se realizaron dos lavados posteriores con etanol al 75 % para eliminar restos de Tripure. La pastilla se resuspendió en 15 μ L de agua libre de nucleasas, se cuantificó y se determinó la integridad del RNA total en geles de agarosa al 1 %.

11.6. TRATAMIENTO CON DNasa

Se llevó a cabo usando el kit DNase I, RNase-free (*Thermo Scientific*®). Las muestras de RNA total recién extraídas, con un ratio 260 nm/280 nm entre 1.8-2, con buena integridad (con bandas nítidas de RNA ribosomal 18S y 28S en el gel de agarosa) y concentraciones de entre 100-300 ng/μL fueron seleccionadas para el siguiente procedimiento.

En un tubo Eppendorf de 200 μL, se colocó la siguiente mezcla: 1 μg de RNA total, 1 μL de buffer de reacción con Mg₂Cl 10X, 1 μL de DNasa I, y c.b.p 10 μL de agua libre de RNasa. La mezcla se incubó a 37 °C por 30 min, posteriormente se le adicionó 1 μL de EDTA 50 mM y se procedió a incubar a 65 °C por 10 min. El producto de cada reacción se utilizó para la síntesis de cDNA.

11.7. SÍNTESIS DE cDNA

La síntesis de cDNA se llevó a cabo usando el kit High Capacity cDNA Reverse Transcription Kits (*Applied Biosystems* ©)

Para cada muestra se realizó lo siguiente. En un tubo eppendorf de 200 μL se agregó los siguientes reactivos: 2 μL buffer RT, 0.8 μL de dNTP *Mix* 25X, 2 μL de *RT random primers* 10X, 1 μL de *MuttsiScribe*™ reverse transcriptase y 4.2 μL de agua libre de nucleasas.

Se colocó la mezcla en un termociclador Axigen y se programó con las condiciones presentadas en la Tabla 10. Las muestras fueron guardadas a 4 °C posteriormente.

Tabla 10. Condiciones de temperatura para la síntesis de cDNA (129).

	Paso 1	Paso 2	Paso 3	Paso 4
Temperatura (°C)	25	37	85	4
Tiempo (Minutos)	10	120	5	∞

11.8. EXPRESIÓN RELATIVA

Se llevó a cabo utilizando Máxima SYBR Green/ROX qPCR Master Mix 2X (*Thermo scientific*®) y cebadores específicos para cada gen cuyas características se muestran en la Tabla 11. Como control endógeno se utilizó *PGK1*, un gen de referencia utilizado para sangre periférica, y de esta manera, valida la comparación de la expresión de *TGF-β1*, *IGF2BP2* y *SOD2* entre la muestra problema y el calibrador. Los detalles de este método se pueden encontrar en el Anexo 3.

Tabla 11. Características de los cebadores utilizados (130).

Gen	Secuencia (5' → 3')		Producto* (b)
<i>TGF-β1</i>	Cebador directo	TACCTGAACCCGTGTTGCTC	119
	Cebador inverso	GCTGAGGTATCGCCAGGAAT	
<i>IGF2BP2</i>	Cebador directo	TGTGCCAGTGCTGAGATAGAG	90
	Cebador inverso	GAGAAGTATCCGGAGTGGGT	
<i>SOD2</i>	Cebador directo	GCTGGAAGCCATCAAACGTG	219
	Cebador inverso	TAGTAAGCGTGCTCCCACAC	
<i>PGK1</i>	Cebador directo	CAAGAAGTATGCTGAGGCTGTCA	68
	Cebador inverso	CAAATACCCCCACAGGACCAT	

* b: bases nitrogenadas

La determinación de la expresión de cada gen (*TGF-β1*, *IGF2BP2* y *SOD2*) se realizó en una placa de 384 pozos por triplicado. Las muestras fueron seleccionadas de acuerdo a los resultados de genotipificación y extracción de RNA total

La mezcla de reacción para cada muestra consistió en los siguientes componentes: 5 µL de Máxima SYBR Green/ROX qPCR Master Mix (2X), 1 µL de cebador directo, 1 µL de cebador inverso, 2 µL de cDNA y 1 µL de agua libre de DNasas para completar un volumen final de 10 µL. Se incluyeron dos controles negativos colocados al azar en la placa. En la Tabla 12 se presentan las concentraciones de los cebadores específicos para cada gen estudiado y la cantidad de cDNA colocada por muestra.

Se utilizó el equipo 7900HT la genotipificación y los software SDS 2.4 y Taqman Genotyper para determinar los valores de C_t * (*cycle threshold*) en cada muestra. Con los valores de C_t por triplicado se realizó un promedio de ellos y se procedió a determinar la expresión relativa de los tres genes estudiados por medio del método $2^{-\Delta\Delta C_t}$.

Tabla 12. Reactivos y cantidades para cada reacción de PCR (131).

Reactivo	Cantidad		
	<i>TGF-B1</i>	<i>IGF2BP2</i>	<i>SOD2</i>
Cebador directo	0.3 µM	0.3 µM	0.05 µM
Cebador inverso	0.9 µM	0.05 µM	0.3 µM
Muestra de cDNA	50 ng/µL	500 ng/µL	150 ng/µL

* Ver anexo 3 para más información.

11.9. ANÁLISIS ESTADÍSTICO

El análisis de los datos de cada gen estudiado se dividió en cinco secciones, presentadas en la Figura 4.

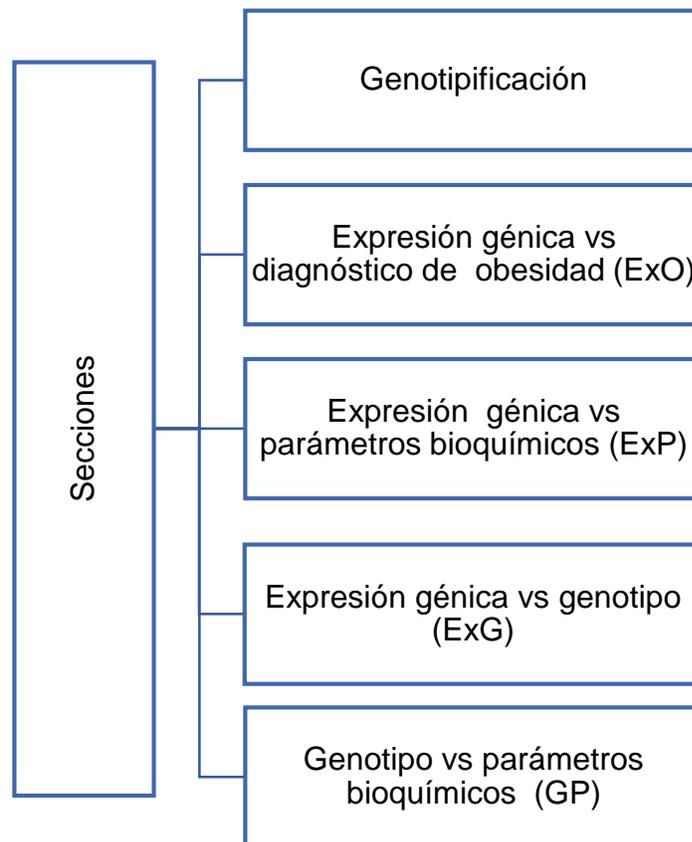


Figura 4. Esquema; división de los resultados por secciones para cada gen.

La primera sección, genotipificación, abarca los resultados de la clasificación de las muestras por genotipo y la selección de muestras para las secciones: ExO, ExP y ExG.

La segunda sección correspondiente a expresión génica vs estado de obesidad, se analizó utilizando *t de Student*. En esta sección se compara expresión génica entre dos grupos: peso saludable y con obesidad.

La tercera sección, expresión génica vs parámetros bioquímicos, fue analizada utilizando *t de Student*. En esta sección solo se presentaran resultados de triglicéridos y colesterol total, esto es debido a dos principales deficiencias, la primera se refiere a la falta de puntos de cohorte de datos aceptados internacionalmente para niños y la segunda corresponde a que nuestra muestra no permitió realizar dicho cohorte.

La cuarta sección, expresión génica vs genotipo, fue analizada con *t de Student*. En esta sección únicamente se utilizaron entre 8 a 12 muestras de cada homocigoto de los SNP estudiados, con excepción del gen *IGF2BP2*, en el cual GT y TT forman un solo grupo ya que el alelo T del rs4401960 es alelo de riesgo para DT2.

La quinta sección correspondiente a la comparación del genotipo vs parámetros bioquímicos fue analizada utilizando ANOVA de una vía. Con excepción del gen *IGF2BP2* debido a que los datos no eran suficientes para un análisis por ANOVA de una vía, por tal motivo los genotipos CT y TT fueron agrupados juntos y se analizaron por medio de una *t de Student*.

En todas las secciones se manejó GraphPad Prism 6 como software de análisis.

12. RESULTADOS

12.1. ANTROPOMETRÍA Y BIOQUÍMICA

Se empleó una muestra de 115 niños entre 6 a 14 años con una edad promedio de 8.8 ± 2.0 años. Los niños se clasificaron de acuerdo a su peso y se organizaron en dos grupos: peso saludable y obesidad. En la Tabla 13 se presenta la comparación de parámetros antropométricos (IMC, edad y circunferencia de la cintura) y bioquímicos (glucosa, colesterol total, triglicéridos, HDL, LDL e insulina).

Tabla 13. Parámetros antropométricos y bioquímicos de la muestra de estudio.

Parámetro	Peso saludable (59)	Obesidad (56)	p	Promedio general (115)	Valores de referencia
IMC* (kg/m ²)	16.5 ± 0.2	24.7 ± 0.4	< 0.0001	20.4 ± 4.8	-
Circunferencia de cintura* (cm)	57.5 ± 0.7	78.5 ± 1.3	< 0.0001	67.7 ± 12.9	-
Glucosa (mg/dL)	86.4 ± 1.1	85.5 ± 1.1	0.6	85.6 ± 8.7	< 110 (56)
Colesterol total (mg/dL)	169.3 ± 3.6	179.1 ± 4.5	0.1	172.4 ± 32.8	< 170 (132)
Triglicéridos (mg/dL)	78.2 ± 4.1	126.3 ± 10.0	< 0.0001	102.2 ± 61.6	< 100 (56)
HDL en niños (mg/dL)	60.1 ± 2.2	50.9 ± 1.9	0.002	53.3 ± 12.6	> 45 (56)
HDL en niñas (mg/dL)	53.7 ± 2.4	48.5 ± 2.5	0.1	53.4 ± 12.5	> 50 (56)
LDL (mg/dL)	106.7 ± 3.0	118.0 ± 4.0	0.02	111.4 ± 24.8	< 130 (133)
Insulina (μU/L)	4.0 ± 0.6	7.4 ± 1.2	0.01	5.5 ± 6.6	≥15 (134)

* El IMC se utilizó para definir el estado de peso, por tal motivo no tiene valor de referencia. La circunferencia de la cintura de igual manera se mide en percentiles con el mismo fin del IMC, en este caso solo se utilizó para describir la muestra utilizada.

Se encontraron diferencias significativas entre los grupos de niños con peso saludable y con obesidad en los siguientes parámetros: IMC, circunferencia de la cintura, triglicéridos, HDL, LDL e insulina. Los parámetros antropométricos: IMC y circunferencia de la cintura tuvieron una diferencia significativa ($p < 0.0001$) bastante marcada entre el grupo de peso saludable y con obesidad, encontrándose que ambos parámetros se presentan elevados en el grupo con obesidad.

En cuanto a los lípidos, los niveles de colesterol total no mostraron diferencias significativas entre ambos grupos. Sin embargo, se encontraron niveles elevados de triglicéridos ($p < 0.0001$) y LDL ($p = 0.02$). Además, se encontraron niveles bajos de HDL ($p = 0.002$) en varones con obesidad. Como se puede observar en la Tabla 13, el promedio de los niveles de triglicéridos para el grupo de obesidad es aproximadamente 1,6 veces mayor que el del grupo de peso saludable.

Por otro lado, los niveles de glucosa no presentaron diferencias significativas entre ambos grupos. No obstante, los niveles de insulina exhibieron una $p = 0.01$, observándose que el grupo de obesidad ($7.4 \pm 1.2 \mu\text{U/L}$) cuenta con niveles elevados en contraste con el grupo de peso saludable ($4.0 \pm 0.5 \mu\text{U/L}$).

12.2. EXTRACCIÓN DE DNA

Se obtuvo un rendimiento de extracción de DNA* de 50-210 µg por cada 5 mL de sangre periférica. La pureza dada por el ratio 260 nm/280 nm estuvo entre 1.7-1.9 indicando que el DNA está libre de contaminación proteica. En la Figura 5 se muestra un corrimiento electroforético en un gel de agarosa al 0.8 % con 100 ng de DNA por pozo.

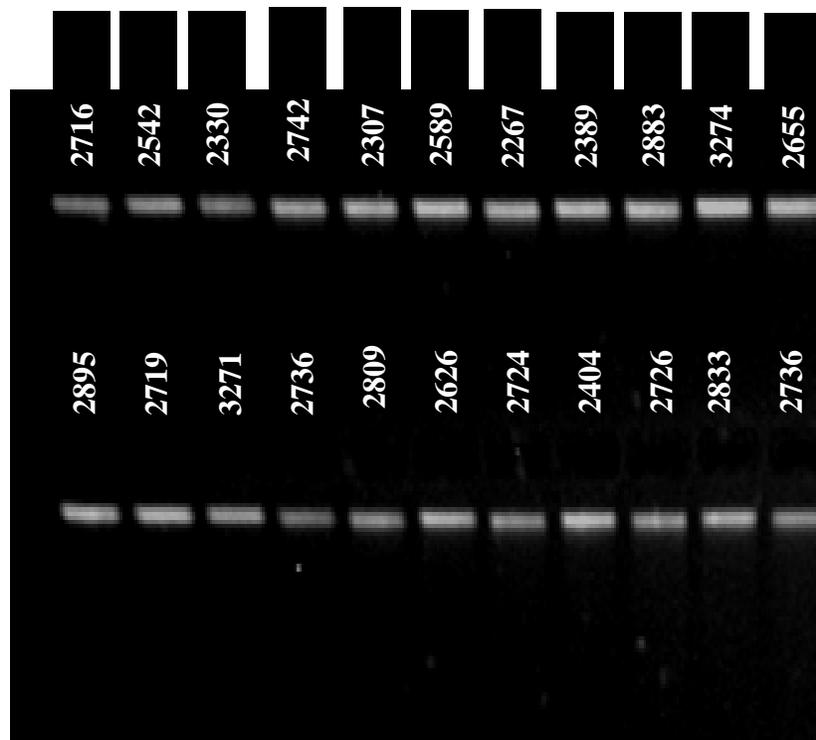


Figura 5. Gel de agarosa al 0.8 %, con 100 ng de DNA en cada pozo, corrido a 80 Volts durante 40 minutos.

* La extracción de DNA fue realizada por el personal que participo en el proyecto GOIA.

12.3. EXTRACCIÓN DE RNA

El rendimiento obtenido de la extracción de RNA a partir de sangre periférica fue de aproximadamente 1 µg de RNA con una concentración entre 100- 300 ng/µL con una relación 260 nm/280 nm de 1.8-2. La integridad del RNA se corroboró en geles de agarosa al 1 %, corridos a 80 volts durante 40 minutos. Para el estudio se eligieron aquellas muestras con una buena integridad. En la Figura 6 se observan las dos subunidades ribosomales intactas y sin contaminación de DNA.

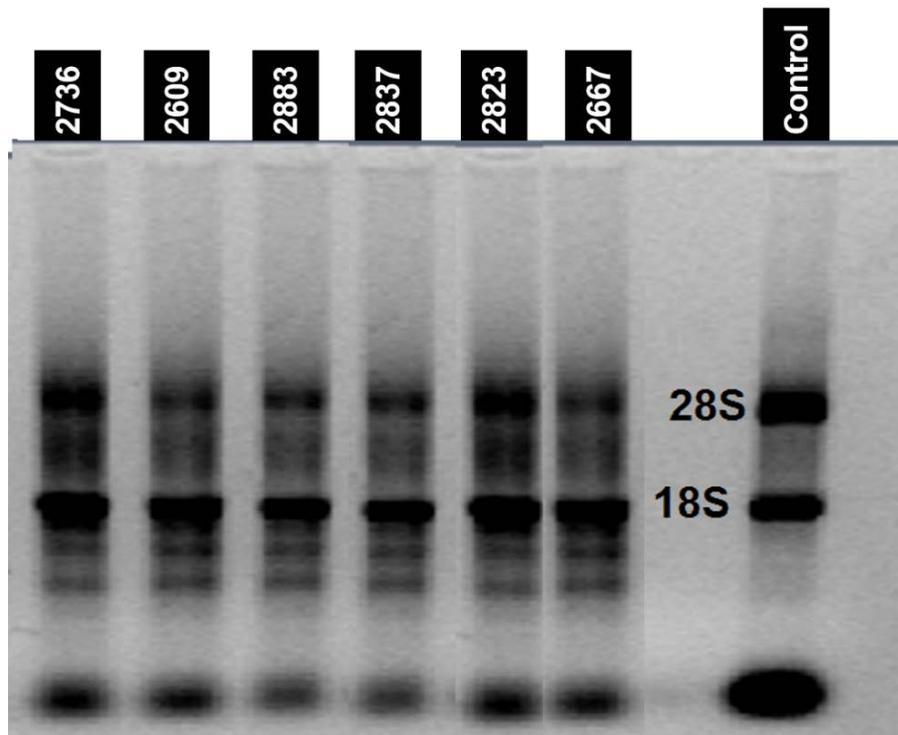


Figura 6. Electroforesis de RNA total en un gel de agarosa al 1 %

12.4. RESULTADOS DEL GEN TGF- β 1

12.4.1. GENOTIPIFICACIÓN

De las 115 muestras, 82 fueron genotipificadas con éxito y clasificadas en tres grupos de acuerdo a los alelos del rs1800470 (alelo ancestral: C y alelo variante T). La clasificación por grupos se presenta en la Tabla 14, mientras que en la Figura 7 se muestra de forma gráfica los resultados de la genotipificación del rs1800470.

Tabla 14. Clasificación por genotipo del rs1800470

Nombre del grupo	Genotipo
Homocigotos para el alelo ancestral	CC
Homocigotos para el alelo variante	TT
Heterocigotos	CT

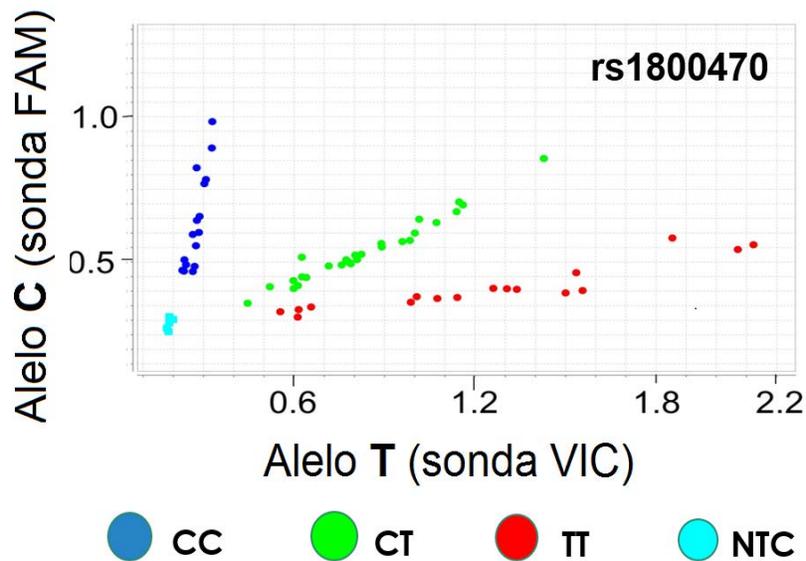


Figura 7. Genotipificación del rs1800470. Alelo ancestral: C y alelo variante: T. Cada punto representa una muestra y el color simboliza el genotipo al cual corresponde. NTC se refiere a los controles negativos utilizados.

A partir de la genotipificación realizada se seleccionaron entre 8 y 12 muestras, y se les extrajo RNA, para el análisis de la sección expresión génica vs genotipo (ExG), mismas que fueron utilizadas en las secciones de expresión vs diagnóstico de obesidad (ExO) y expresión vs parámetros bioquímicos (ExP).

Para el análisis de la sección ExG se seleccionaron 8 muestras del genotipo CC y nueve muestras para el genotipo TT. Las cuales presentaron una genotipificación óptima, una buena integridad y cantidad del RNA total. Estas muestras fueron agrupadas de acuerdo al diagnóstico de obesidad para el análisis de la sección ExO, mientras que para la sección ExP fueron agrupadas de acuerdo a los puntos de cohorte de los parámetros bioquímicos específicos para niños.

12.4.2. EXPRESIÓN GÉNICA VS DIAGNÓSTICO DE OBESIDAD

Como se mencionó en la sección anterior las muestras analizadas en este apartado fueron clasificadas en dos grupos, aquellas con peso saludable (ocho sujetos) y aquellas con diagnóstico de obesidad (nueve sujetos). Para el análisis de esta sección se utilizó *t de Student* como prueba estadística, cuyos resultados se pueden apreciar en la Figura 8.

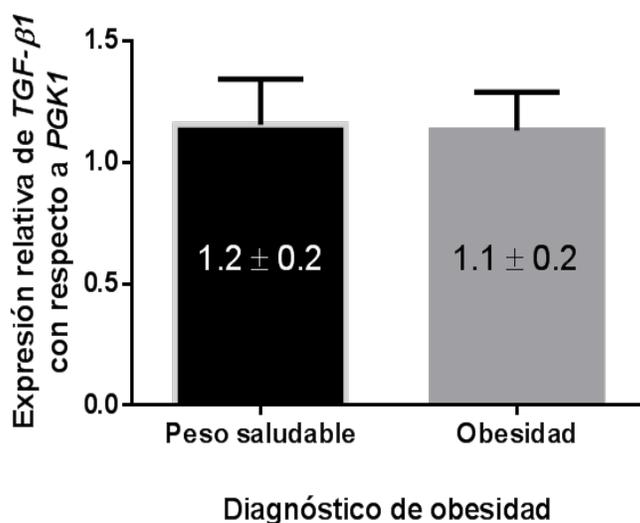


Figura 8. Expresión génica de $TGF-\beta 1$ vs el diagnóstico de obesidad, $p= 0.92$.

La expresión génica de $TGF-\beta 1$ en el grupo de peso saludable fue de 1.2 ± 0.2 , mientras que en el grupo de niños diagnosticados con obesidad fue de 1.1 ± 0.2 . Estos resultados indican que no hay diferencias significativas en la expresión génica de $TGF-\beta 1$ ($p= 0.92$) entre ambos grupos.

12.4.3 EXPRESIÓN GÉNICA VS PARÁMETROS BIOQUÍMICOS

Para el análisis de esta sección únicamente se utilizaron dos parámetros bioquímicos de los seis considerados para este estudio: colesterol total y triglicéridos. Esto debido principalmente a dos razones, la primera corresponde a los puntos de cohorte que indican anormalidades en los parámetros bioquímicos, ya que no existen puntos de cohorte en niños para algunos parámetros (LDL e insulina). La segunda razón corresponde a que los resultados de los parámetros bioquímicos de las muestras estudiadas no permitieron utilizar el punto de cohorte establecido, porque en ciertos casos la mayoría de los datos estaban por debajo del punto de cohorte (glucosa, HDL).

El punto de cohorte utilizado para colesterol total fue el siguiente: se consideraron controles a las muestras que presentaron niveles menores a 170 mg/dL (ocho muestras) y casos aquellas con niveles iguales o mayores a 170 mg/dL (diez muestras). Este punto de cohorte fue tomado de Romualdo C, *et al.* (132), quien estudio niños entre 5 y 14 años.

Asimismo, el punto de cohorte utilizado para los triglicéridos fue el siguiente: se consideraron controles a aquellas muestras con niveles menores a 100 mg/dL (cinco muestras) y casos aquellas con niveles iguales o mayores a 100 mg/dL (doce muestras). Estos datos fueron tomados de Guerrero RF, *et al.* (135) para niños con una edad de entre 6 y 11 años.

La prueba estadística utilizada para el análisis de esta sección fue t de *Student*, cuyos resultados se presentan en la Tabla 15.

Tabla 15. Expresión génica de *TGF-β1* vs parámetros bioquímicos.

Parámetros bioquímicos.	Promedio de expresión relativa ± DE		p
	Controles*	Casos*	
Colesterol total (mg/dL)	1.1 ± 0.1	1.5 ± 0.2	0.2
Triglicéridos (mg/dL)	1.1 ± 0.1	1.4 ± 0.3	0.3

*Controles: niveles < 170 mg/dL para colesterol total y < 100 mg/dL para triglicéridos. Casos: niveles ≥ 170 mg/dL para colesterol y ≥ 100 mg/dL para triglicéridos.

Los resultados del colesterol total vs la expresión génica de *TGF-β1* en el grupo de controles fue de 1.1 ± 0.1 y 1.5 ± 0.2 en el grupo de casos. En cuanto a los triglicéridos, la expresión génica del grupo de controles fue de 1.1 ± 0.1, mientras que en el grupo de casos fue de 1.4 ± 0.3.

Los resultados de colesterol total (p= 0.2) y triglicéridos (p= 0.3) no muestran diferencias significativas en la expresión génica entre el grupo de controles y el grupo de casos.

12.4.4. EXPRESIÓN GÉNICA VS GENOTIPO

Se determinó la expresión del gen *TGF-β1* en ocho muestras homocigotas para el alelo ancestral (C) y nueve muestras homocigotas para el alelo variante (T).

El análisis de los datos realizado por *t de Student* indica que la expresión del gen *TGF-β1* fue mayor en los niños homocigotos para el alelo variante (2.0 ± 0.2) respecto al alelo ancestral (1.1 ± 0.2). Asimismo, se puede apreciar en la Figura 9 que los niveles de expresión génica en el grupo de homocigotos para el alelo variante es aproximadamente el doble ($p= 0.003$) que en el de los homocigotos para el alelo ancestral

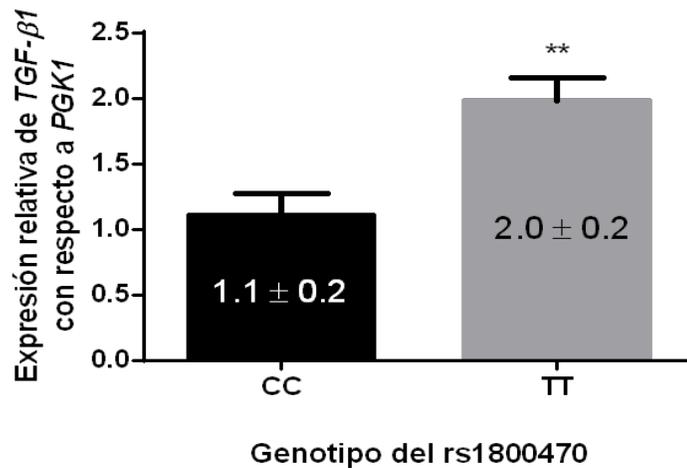


Figura 9. Expresión génica de *TGF-β1* vs el genotipo del rs1800470, alelo ancestral: C, alelo variante: T, ** $p= 0.003$.

12.4.5. GENOTIPO VS PARÁMETROS BIOQUÍMICOS

Los grupos clasificados de acuerdo al genotipo del rs1800470 que fueron analizados en esta sección estuvieron formados por 24 muestras homocigotas para el ancestro (C), 38 muestras heterocigotas (CT) y 20 muestras homocigotas para la variante (T). Para analizar las posibles diferencias en los niveles de parámetros bioquímicos de los niños como resultado del genotipo, se utilizó como prueba de análisis estadístico ANOVA de una vía, cuyos resultados se presenta en la Tabla 16.

Tabla 16. Genotipo del rs1800470 vs parámetros bioquímicos.

Parámetros \ Genotipo	rs1800470 (<i>TGF-β1</i>)			
	CC (24)	CT (38)	TT (20)	p
Glucosa (mg/dL)	81.4 ± 1.4	88.7 ± 1.4	86.6 ± 2.0	0.004
Colesterol total (mg/dL)	174.3 ± 5.8	163.9 ± 4.6	184.6 ± 7.7	0.04
Triglicéridos (mg/dL)	84.9 ± 6.3	98.4 ± 10.9	113.0 ± 13.5	0.32
HDL (mg/dL)	56.0 ± 2.7	52.9 ± 1.8	50.4 ± 4.0	0.07
LDL (mg/dL)	113.0 ± 5.3	103.4 ± 3.7	118.3 ± 6.4	0.08
Insulina (μU/L)	4.1 ± 1.2	5.3 ± 1.4	6.2 ± 1.2	0.64

A pesar de tener una muestra pequeña, con ANOVA de una vía se identificaron diferencias significativas en los niveles de glucosa ($p= 0.004$) entre los genotipos del rs1800470. Posteriormente se realizó un análisis estadístico con *t de Student*

obteniendo diferencias significativas (Figura 10) entre los siguientes grupos: CC vs TC ($p= 0.0008$) y CC vs TT ($p= 0.04$). El promedio de niveles de glucosa más elevado lo presentó el grupo de heterocigotos (CT), con 88.7 ± 1.4 mg/dL.

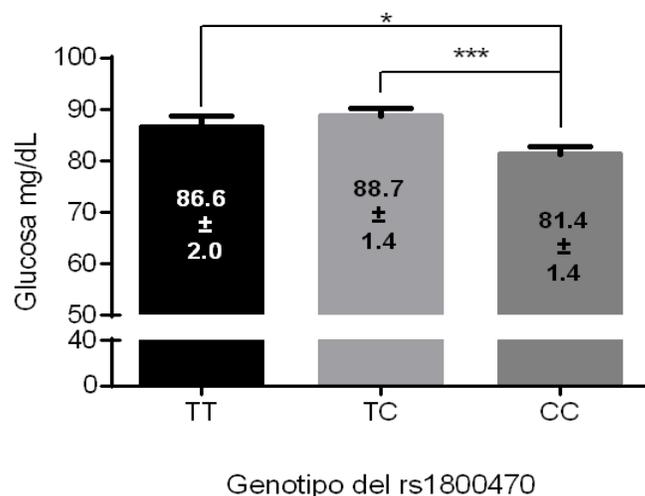


Figura 10. Glucosa vs el genotipo del rs1800470 por *t* de Student. *CC vs TT, $p= 0.04$. * CC vs TC, $p= 0.0008$**

En cuanto a los lípidos, el colesterol total fue el único parámetro que mostro una diferencia significativa ($p= 0.04$) al utilizar ANOVA de una vía. El genotipo con mayores niveles de colesterol total fue de homocigotos para la variante (TT) con 184.6 ± 7.7 mg/dL, y el de menor promedio fue CT con 163.9 ± 4.6 mg/dL. Un análisis posterior con *t* de Student (Figura 11) mostro una diferencia significativa entre el grupo TT y CT ($p= 0.02$).

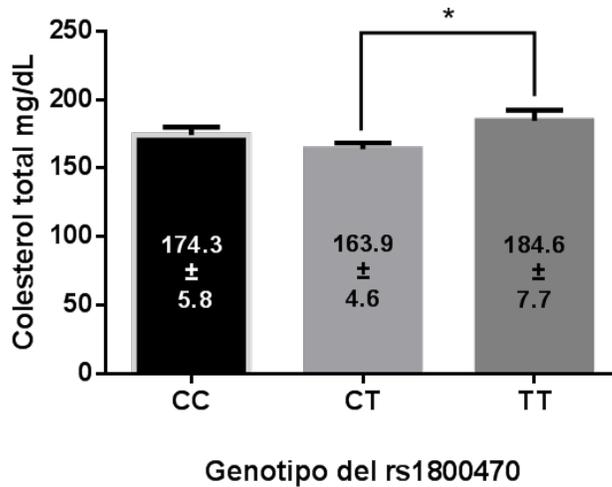


Figura 11. Colesterol total vs el genotipo del rs1800470, análisis con *t* de Student. * TT vs CT, $p= 0.02$

No se encontraron diferencias significativas entre el genotipo del rs1800470 y los niveles de triglicéridos ($p= 0.32$), HDL ($p= 0.07$) y LDL ($p= 0.08$) cuando se analizaron con ANOVA de una vía. No obstante, al comparar los genotipos TT y CT con respecto a los valores de LDL (Figura 12), se encontró una diferencia significativa ($p= 0.03$)

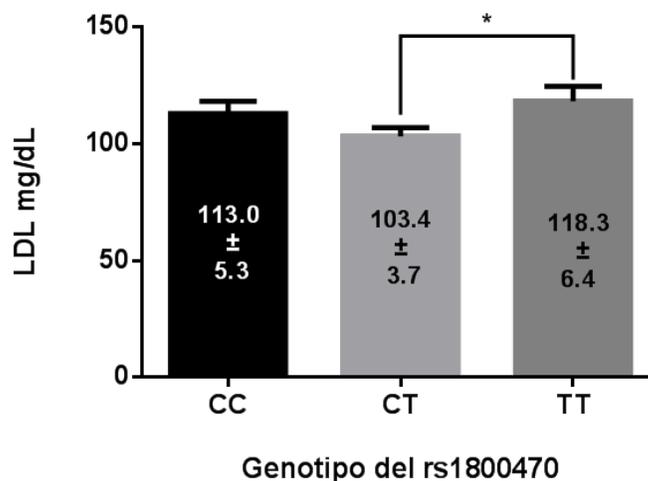


Figura 12. LDL vs el genotipo del rs1800470. *TT vs CT, $p= 0.03$

Este análisis realizado por *t de Student* demostró que el genotipo TT tienen niveles más elevados que los (118.3 ± 6.4 mg/dl) que los heterocigotos (103.4 ± 3.7 mg/dl.)

12.5. RESULTADOS DEL GEN IGF2BP2

12.5.1 GENOTIPIFICACIÓN

De las 115 muestras, 93 fueron genotípificadas con éxito (Figura 13) y agrupadas en tres grupos (Ver Tabla 17) de acuerdo a los alelos del rs4402960 (G: ancestral y T: variante).

Tabla 17. Clasificación por genotipo del rs4402960.

Nombre del grupo	Genotipo
Homocigotos para el alelo ancestral	GG
Homocigotos para el alelo variante	TT
Heterocigotos	GT

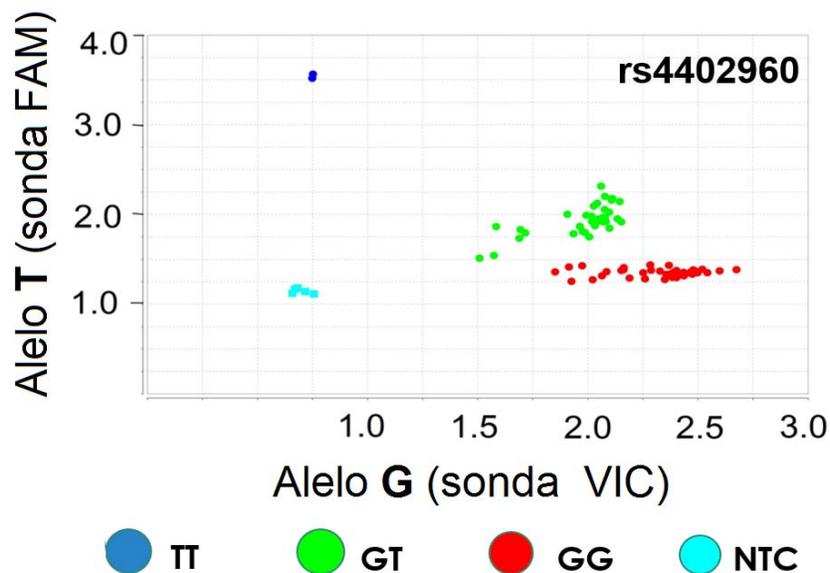


Figura 13. Genotipificación del rs4402960. Alelo ancestral: G, alelo variante: T. Cada punto representa una muestra, el color simboliza el genotipo al cual corresponde. NTC se refiere a los controles negativos utilizados.

Se seleccionaron las muestras a analizar para las secciones ExG, ExO y ExP de la misma forma en la que se describió en la sección de genotipificación del gen *TGF-β1*. Debido a la baja cantidad de muestras homocigotas para el alelo de riesgo (T) se optó por unir los genotipo GT y TT para el análisis de la sección ExG, de esta manera se seleccionaron 11 muestras con genotipo CC, 9 muestras para los genotipos GT y TT,, así, se analizaron dos grupos en la sección ExG (GG vs GT + TT). Al igual que en la sección de genotipificación del gen *TGF-β1*, las muestras seleccionadas fueron agrupadas de acuerdo al diagnóstico de obesidad y de acuerdo a los puntos de corte de los parámetros bioquímicos específicos para niños, con el fin de realizar el análisis de la sección ExO y ExP respectivamente.

12.5.2 EXPRESIÓN GÉNICA VS DIAGNÓSTICO DE OBESIDAD

Las muestras analizadas en esta sección fueron seleccionadas como lo indica la sección anterior, y clasificada en dos grupos: peso saludable (7 sujetos) y con obesidad (13 sujetos). Para el análisis de esta sección se utilizó *t de Student* cuyos resultados se presentan en la Figura 14.

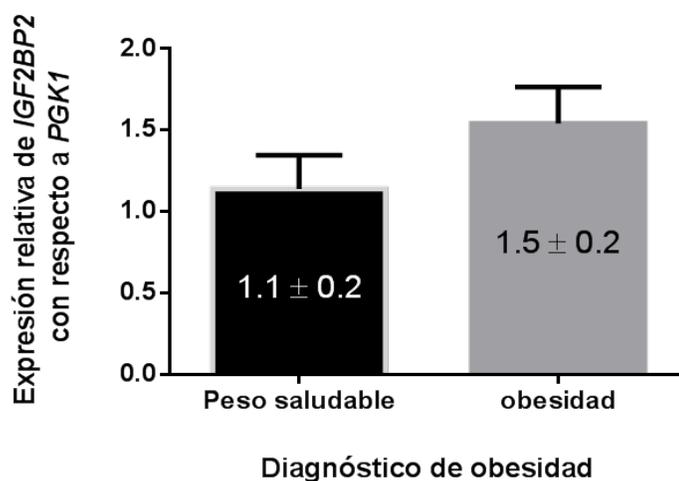


Figura 14. Expresión génica de *IGF2BP2* vs el diagnóstico de obesidad, $p= 0.3$.

El promedio de expresión relativa del gen *IGF2PB2* en el grupo de peso saludable fue de 1.1 ± 0.2 mientras que en el grupo con obesidad fue de 1.5 ± 0.2 . Los resultados demuestran que no hubo diferencias significativas entre ambos grupos y la expresión relativa de *IGF2BP2* ($p= 0.3$).

12.5.3. EXPRESIÓN GÉNICA VS PARÁMETROS BIOQUÍMICOS

Se seleccionaron las muestras a analizar cómo se mencionó en la sección de genotipificación. Para el análisis de los parámetros bioquímicos: colesterol total y triglicéridos se utilizó t de *Student* como prueba estadística, cuyos resultados se presentan en la Tabla 18.

Tabla 18. Expresión génica de *IGF2BP2* vs parámetros bioquímicos.

Parámetros bioquímicos.	Promedio de expresión relativa \pm DE		p
	Controles*	Casos*	
Colesterol total (mg/dl)	1.0 \pm 0.04	0.9 \pm 0.1	0.2
Triglicéridos (mg/dl)	1.1 \pm 0.1	1.6 \pm 0.3	0.1

*Controles: niveles < 170 mg/dL para colesterol total y < 100 mg/dL para triglicéridos. Casos: niveles \geq 170 mg/dL para colesterol y \geq 100 mg/dL para triglicéridos.

En el análisis de colesterol total se obtuvieron los siguientes resultados: el grupo de controles presento un promedio de expresión génica relativa de 1.0 ± 0.04 mientras que en el de casos fue de 0.9 ± 0.1 . Los resultados demuestran que no existe una diferencia significativa entre los niveles de expresión génica de *IGF2BP2* y los niveles de colesterol total ($p= 0.2$).

En cuanto al análisis de triglicéridos, el grupo de controles (14 sujetos) presento 1.1 ± 0.1 niveles de expresión génica, mientras que en el grupo de casos (8 sujetos)

fue de 1.6 ± 0.3 . Los resultados indican que no hay diferencias significativas entre los niveles de triglicéridos y la expresión génica de *IGF2BP2* ($p= 0.1$).

12.5.4. EXPRESIÓN GÉNICA VS GENOTIPO

Para el análisis de esta sección se utilizaron 11 muestras homocigotas para el alelo ancestral (G), y 9 muestras que presentaron el alelo de riesgo (T). Estas últimas comprenden tanto sujetos homocigotos para el alelo de riesgo (TT) como sujetos heterocigotos (GT). En la Figura 15 se presenta los resultados de esta sección.

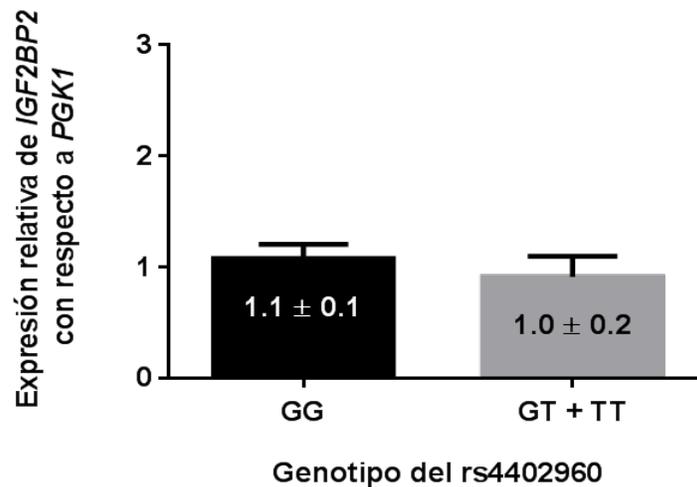


Figura 15. Expresión génica de *IGF2BP2* vs el genotipo del rs4402960, alelo ancestral: G, alelo variante: T, $p= 0.4$.

La Figura 15 presenta la gráfica de la expresión relativa del gen *IGF2BP2* y el genotipo del rs4402960. Los resultados muestran que el genotipo GG tuvo un promedio de

expresión génica de 1.1 ± 0.1 , mientras que el grupo conformado por los genotipos TT y GT tuvo 1.0 ± 0.2 . Dichos resultados señalan que no hay diferencias significativas entre la expresión relativa de IGF2BP2 y el genotipo del rs4402960.

12.5.5. GENOTIPO VS PARÁMETROS BIOQUÍMICOS

El análisis de GG vs GT +TT con respecto a los parámetros bioquímicos se realizó con *t de Student* (Tabla 19). Sin embargo, no se ninguna diferencia significativa en los seis parámetros bioquímicos estudiados (glucosa, colesterol total, triglicéridos, HDL, LDL e insulina).

Tabla 19. Genotipo del rs4402960 vs parámetros bioquímicos.

Parámetro \ Genotipo	rs4402960 (IGF2BP2)		
	GG (50)	GT + TT (43)	P
Glucosa (mg/dL)	85.5 ± 1.1	87.4 ± 1.4	0.3
Colesterol total (mg/dL)	173.8 ± 4.1	173.4 ± 4.0	0.9
Triglicéridos (mg/dL)	98.7 ± 6.3	96.3 ± 9.8	0.8
HDL (mg/dL)	54.9 ± 1.9	54.4 ± 1.8	0.8
LDL (mg/dL)	111.5 ± 3.4	110.3 ± 4.3	0.8
Insulina (μ U/L)	4.6 ± 0.7	5.6 ± 1.2	0.4

12.6. RESULTADOS DEL GEN SOD2

12.6.1. GENOTIPIFICACIÓN

De las 115 muestras, 92 fueron genotípificadas con éxito y clasificadas en tres grupos de acuerdo a los alelos del rs4880 (alelo ancestral: C y alelo variante: T). La clasificación por grupos se presenta en la Tabla 20 y en la Figura 16 se presentan de manera gráfica los resultados de la genotipificación del rs4880.

Tabla 20. Clasificación por genotipo de acuerdo a los alelos del rs4880

Nombre del grupo	Genotipo
Homocigotos para el alelo ancestral	CC
Homocigotos para el alelo variante	TT
Heterocigotos	CT

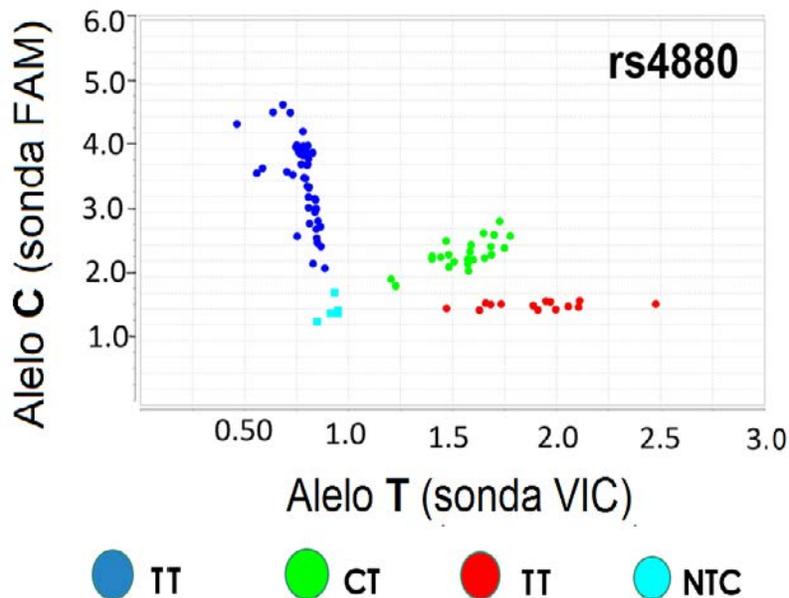


Figura 16. Genotipificación del rs4880. Alelo ancestral: C, alelo variante: T. Cada punto representa una muestra y el color el genotipo al cual corresponde. NTC se refiere a los controles negativos.

Se seleccionaron las muestras a analizar para las secciones ExG, ExO y ExP de la misma manera en la que se describió en la genotipificación del gen *TGF-β1*.

Para el análisis de la sección ExG se seleccionaron 10 muestras con genotipo CC y 8 muestras con genotipo TT. Estas mismas muestras se utilizaron para el análisis de las secciones ExO y ExP, agrupándolas por el diagnóstico de obesidad y los parámetros bioquímicos específicos para niños respectivamente.

12.6.2 EXPRESIÓN GÉNICA VS DIAGNÓSTICO DE OBESIDAD

Las muestras analizadas en esta sección fueron clasificadas en dos grupos: peso saludable (7 sujetos) y obesidad (12 sujetos) y analizados por medio de *t de Student*.

En la Figura 17 se presentan los resultados obtenidos

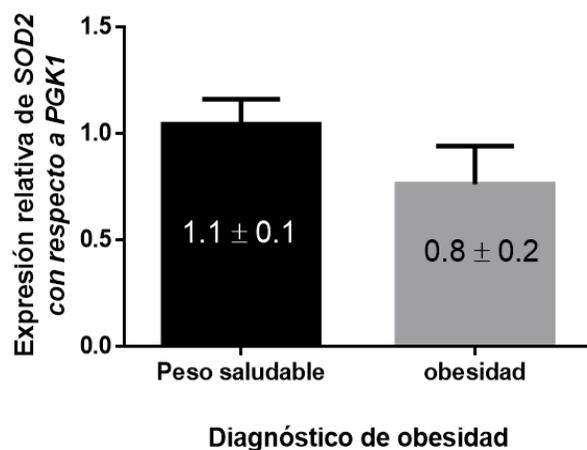


Figura 17. Expresión del gen SOD2 vs el diagnóstico de obesidad, $p= 0.3$.

La expresión génica en el grupo de peso saludable fue de 1.1 ± 0.1 mientras que en el grupo de obesidad fue de 0.8 ± 0.2 . Dichos resultados demuestran que la expresión génica del SOD2 no se ve afectada por el estado de peso ($p= 0.3$).

12.6.3 EXPRESIÓN GÉNICA VS PARÁMETROS BIOQUÍMICOS

El análisis de esta sección que como se comentó anteriormente fue realizado únicamente para colesterol total y triglicéridos se realizó por medio de *t de Student*.

Para el análisis de colesterol total vs expresión génica, se utilizaron 11 sujetos como controles y 8 como casos. En cuanto al análisis de triglicéridos vs expresión génica se utilizaron 11 sujetos como controles y 7 como casos. En la Tabla 21 se pueden apreciar los resultados obtenidos.

Tabla 21. Expresión génica de *SOD2* vs parámetros bioquímicos.

Parámetros bioquímicos	Promedio de expresión relativa \pm DE		p
	Controles*	Casos*	
Colesterol total (mg/dl)	1.1 \pm 0.2	1.7 \pm 0.3	0.93
Triglicéridos (mg/dl)	1.2 \pm 0.2	1.4 \pm 0.4	0.70

*Controles: niveles < 170 mg/dL para colesterol total y < 100 mg/dL para triglicéridos. Casos: niveles \geq 170 mg/dL para colesterol y \geq 100 mg/dL para triglicéridos.

Los resultados de la comparación del colesterol total vs expresión génica se encontraron niveles de expresión del gen *SOD2* fue de 1.1 \pm 0.2 en el grupo de controles y 1.7 \pm 0.3 en el grupo de casos. En cuanto al análisis de triglicéridos vs expresión génica, el grupo de controles presento 1.2 \pm 0.2 niveles de expresión génica de *SOD2* mientras que en el grupo de casos fue de 1.4 \pm 0.4. El análisis de colesterol total y triglicéridos no mostró ninguna diferencia significativa entre los niveles de estos parámetros bioquímicos y la expresión génica de *SOD2*.

12.6.4 EXPRESIÓN GÉNICA VS GENOTIPO

Para el análisis de esta sección se utilizaron 10 muestras con genotipo CC y 8 con genotipo TT. El análisis se realizó por medio de *t de Student*, cuyos resultados se presentan en la Figura 18.

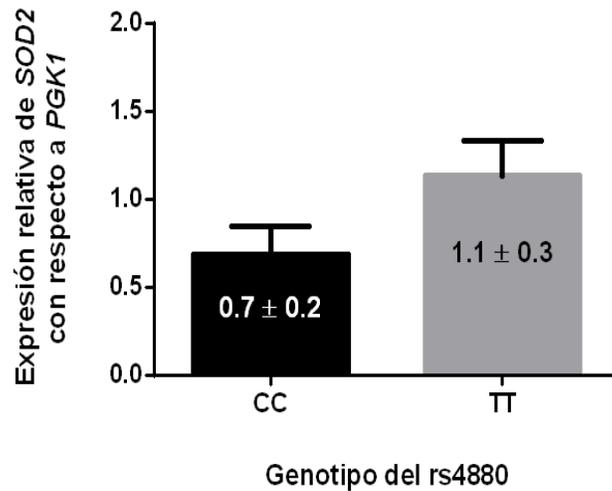


Figura 18. Expresión génica del gen *SOD2* vs el genotipo del rs4880. Alelo ancestral: C y alelo variante: T, $p= 0.09$.

EL promedio de los niveles de expresión del genotipo CC fue de 0.7 ± 0.2 mientras que para el genotipo TT fue 1.1 ± 0.3 , dichos resultados indican que no hay diferencia significativa entre la expresión génica de *SOD2* y el genotipo del rs4880 ($p= 0.09$).

12.6.5. GENOTIPO VS PARÁMETROS BIOQUÍMICOS

Para este análisis se utilizó como método estadístico ANOVA de una vía para el rs4880 (*SOD2*), comparando cada genotipo con los parámetros bioquímicos; glucosa, colesterol total, triglicéridos, LDL, HDL e insulina. En la Tabla 22 se presentan los resultados

Tabla 22. Genotipo del rs4880 vs parámetros bioquímicos.

Parámetros \ Genotipo	rs4880 (<i>SOD2</i>)			
	CC (45)	CT (24)	TT (13)	p
Glucosa (mg/dL)	86.8 ± 1.5	85.4 ± 1.4	86.8 ± 1.7	0.8
Colesterol total (mg/dL)	175.1 ± 4.4	175.3 ± 6	170.3 ± 12.3	0.5
Triglicéridos (mg/dL)	110.9 ± 9.0	91.3 ± 9.5	112.8 ± 28.9	0.4
HDL (mg/dL)	52.6 ± 1.8	58.2 ± 3.1	49.9 ± 3.3	0.5
LDL (mg/dL)	115.2 ± 3.7	106.8 ± 4.6	110.5 ± 9.5	0.4
Insulina (μU/L)	6.3 ± 1.3	3.3 ± 0.5	4.9 ± 2.1	1.4

Los resultados del rs4880 no demostraron significancia con ninguno de los parámetros bioquímicos.

DISCUSIÓN

La obesidad, el SM y la DT2 se caracterizan por el desarrollo de alteraciones en los niveles normales de algunos parámetros antropométricos y bioquímicos. Principalmente del IMC, la circunferencia de la cintura, los lípidos y la glucosa. Particularmente, el IMC, se utiliza para definir el bajo peso, el peso saludable, el sobrepeso y la obesidad en los niños (122). La circunferencia de la cintura puede utilizarse como un buen predictor de riesgo para DT2 e hipertensión arterial, además, de estar asociado con resistencia a la insulina (136,137). Las alteraciones en los lípidos están estrechamente relacionadas con alteraciones metabólicas, mientras que altos niveles de glucosa son característicos de DT2 (3,55,75).

En este estudio se corroboran diferencias significativas en algunos parámetros bioquímicos y antropométricos entre los grupos de niños con peso saludable y con obesidad. En primera instancia, encontramos que el IMC (16.5 ± 0.2 vs 24.7 ± 0.4) y la circunferencia de la cintura (57.5 ± 0.7 vs 78.5 ± 1.3) presentaron diferencias significativas entre los dos grupos ($p < 0.0001$, en ambos casos). Estos resultados muestran el mayor riesgo que poseen los niños con obesidad a desarrollar enfermedades metabólicas, que se evidencia, aún más cuando se observan las alteraciones en algunos parámetros bioquímicos, como es el perfil de lípidos, que presentó niveles elevados de triglicéridos (78.2 ± 4.1 mg/dL vs 126.3 ± 10.0 mg/dL, $p < 0.0001$) y LDL (106.7 ± 3.0 mg/dL vs 118.0 ± 4.0 mg/d, $p = 0.02$), así como bajos niveles de HDL en varones (60.1 ± 2.2 mg/dL vs 50.9 ± 1.9 mg/dL, $p = 0.002$) en el grupo de obesidad en comparación con el grupo de peso saludable. Dos de los

parámetros bioquímicos medidos en este estudio, que también son indicadores de síndrome metabólico en niños son los triglicéridos y HDL (56). Los resultados muestran que el promedio de los triglicéridos (126.3 ± 10.0 mg/dL) en el grupo de obesidad es mayor que el valor que se considera saludable (≥ 100 mg/dL para niños de 5-14 años) (56). En el caso de HDL; los varones con obesidad tuvieron niveles bajos (50.9 ± 1.9 mg/dL) en comparación con los de peso saludable (60.1 ± 2.2 mg/dL). Sin embargo, estos valores se consideran normales, debido a que están por encima del punto de cohorte propuesto (< 45 mg/dL en niños) (56). En cuanto a los valores de HDL en las niñas, el grupo con obesidad tuvo 48.5 ± 2.5 mg/dL, lo que indica que esta en el límite de riesgo (< 50 mg/dL en niñas) (56). A pesar de esto, los resultados no mostraron significancia.

En relación a los niveles de LDL en niños, Gonzalez Devia *et al.* (133) propone que los niveles normales de LDL en niños debe ser menor a 130 mg/dL. Nuestro grupo de niños estudiado (con y sin obesidad) presentaron niveles inferiores a este punto de cohorte. Sin embargo, no encontramos diferencias significativas en los promedios de LDL entre el grupo de niños con peso saludable y con obesidad (106.7 ± 3.0 mg/dL vs 118.0 ± 4.0 mg/dL, respectivamente).

En cuanto a los resultados de glucosa, no se hallaron diferencias significativas ($p= 0.6$) entre el grupo de peso saludable y el de obesidad (86.4 ± 1.1 mg/dL vs 85.5 ± 1.1 mg/dL, respectivamente). No obstante, los niveles de insulina si mostraron una diferencia significativa ($p= 0.01$), siendo el grupo de obesidad el que tiene los niveles más altos de este parámetro (4.0 ± 0.6 μ U/L vs 7.4 ± 1.2 μ U/L), lo que sugiere el desarrollo de resistencia a la insulina en los niños con obesidad, ya que estos niños

tuvieron niveles normales de glucosa y elevados de insulina. Resultados similares fueron observados por McFalin *et al.*(138).

Por otro lado, el diagnóstico de obesidad no se asoció con la expresión génica para ninguno de los genes estudiados. Asimismo, en ninguno de los genes se encontró relación entre la expresión génica y los parámetros bioquímicos (colesterol total y triglicéridos) cuando las muestras fueron clasificadas de acuerdo a los valores de referencia normales para la población infantil.

Al comparar la expresión de los genes *TGF-β1*, *IGF2BP2* y *SOD2* de acuerdo al genotipo de los rs1800470, rs4402960 y rs4880, se demostró que el único SNP que modifica los niveles de mRNA es el rs1800470, localizado en el primer exón del gen *TGF-β1*. En este caso el genotipo TT correlaciona con mayores niveles de mRNA del gen (1.1 ± 0.2 para TT vs 2.0 ± 0.2 para CC, $p= 0.003$). Esto puede deberse a que el rs1800470 cree o modifique alguna secuencia consenso de un factor de transcripción, el cual a su vez puede activar o potenciar la transcripción del gen. Por otro lado, aunque se cree que el rs1800470 es importante en el desarrollo de enfermedades tales como obesidad, DT2 y ECV. Se sugiere la posibilidad de que este SNP actúe en conjunto con otros polimorfismos, para facilitar el desarrollo de estas enfermedades, un buen candidato puede ser el rs1800469, que está en DL con el SNP estudiado, y que puede encontrarse en un sitio del factor de transcripción YY1 (95,96). YY1, también conocido como ying-yang 1, está envuelto en la activación o represión de promotores, y también puede modificar la función de las histonas (139).

Nuestros resultados analizados con ANOVA, muestran que los genotipos del rs1800470 están asociados con altos niveles de glucosa ($p= 0.004$) y colesterol total ($p= 0.04$). Además, LDL ($p= 0.03$), resultado asociado al mismo SNP con *t de Student*.

En el caso de la glucosa, el análisis de datos con ANOVA de una vía mostró, que los portadores del genotipo CC (81.4 ± 1.4 mg/dL) tiene niveles de glucosa menores que el CT (88.7 ± 1.4 mg/dL) y los portadores del genotipo TT (86.6 ± 2.0 mg/dL). Esto se corroboró mediante *t de Student*, en los que se compararon los siguientes genotipos; CC vs CT ($p= 0.0008$) y CC vs TT ($p= 0.04$). Puesto que los niveles de glucosa fueron mayores en portadores de los genotipos TT y CT, es posible que el alelo T sea en parte responsable de esta elevación de glucosa.

Yang WS *et al.* (140) reportaron que los altos niveles de glucosa incrementan la expresión génica de *TGF- β 1* en células humanas del epitelio tubular. Mientras que Sharma k *et al.* (141) encontraron, que altos niveles de glucosa elevan los niveles de mRNA y de la proteína TGF- β 1 en células mesenquiales del riñón de ratas con nefropatía diabética. En este trabajo nosotros proponemos que la elevación de los niveles de glucosa en niños, está asociada al genotipo que estos presenten; y que los niños portadores del alelo T presentan mayor riesgo de tener glucosa elevada.

Aunque no se cuenta con mucha información acerca del papel que juega TGF- β 1 en el metabolismo de la glucosa, se sabe, que la unión de la proteína activa TGF- β 1 a los receptores conocidos como TBR-II, desencadena una cascada de señalización que activa residuos de Smad. Estos por su parte, regulan la expresión de ciertos genes,

entre ellos el gen de la insulina y el *PAI-1* (que es el principal inhibidor del activador tisular del plasminógeno) (142,143)

Los residuos de Smad 3 activados por esta vía reprimen la transcripción del gen de la insulina, lo que contribuye a un aumento de glucosa (143); y por consiguiente a un aumento en la expresión de *TGF-β1*, de acuerdo con los hallazgos de Sharma y Yang (140,141). La retroalimentación entre el aumento de glucosa y el mRNA de *TGF-β1*, el cual se expresa mayormente en portadores del alelo T según este estudio, podría ser parcialmente responsable de la asociación que se ha observado entre el SNP, rs1800470 y enfermedades como la nefropatía diabética y las ECV (84,90). La activación de Smad, también activa la transcripción de *PAI-1*, cuyos niveles elevados de proteína se han asociado a riesgo de trombosis en pacientes con obesidad (142).

Por otra parte, los niños con genotipo TT (genotipo con mayor expresión de mRNA de *TGF-β*) presentaron altos niveles de colesterol total (184.6 ± 7.7 mg/dL, $p= 0.02$) y LDL (118.3 ± 6.4 mg/dL, $p= 0.03$). Vinagre I *et al.* (144) ha reportado en sujetos con DT2, que mayores niveles de LDL se asocian con niveles elevados de la proteína TGF-β1. No obstante, el efecto de esta proteína en los lípidos es un hecho descrito reciente y poco claro. Sin embargo, la sinergia entre TGF-β1 y la obesidad puede ser el punto clave, puesto que, Raju Y *et al.* (145) encontró sobre expresada esta proteína en plaquetas de ratas Zuker obesas. Este hallazgo merece ser estudiado con detalle en futuras investigaciones.

La relación de TGF- β 1 con otros padecimientos tales como enfermedades renales, se debe principalmente a que es un potente inductor en la síntesis de matriz extracelular, también llamada MEC, lo que puede inducir fibrosis en estos tejidos (141). Además, su implicación con enfermedades vasculares, se ha relacionado con la producción de ROS, deposiciones de colágeno, así como la síntesis de la MEC (146). La asociación del rs1800470 con una mayor expresión de *TGF- β 1*, niveles elevados de glucosa, colesterol total y LDL sugiere que contribuyen a desarrollar complicaciones tales como DT2, nefropatía diabética y ECV. Cabe mencionar, que la forma activa de esta proteína es la que se ha implicado con ECV y nefropatía diabética, por tanto, aún se requiere realizar estudios, que permitan determinar si los niveles elevados de *TGF- β 1* que observamos en portadores del alelo T correlacionan con los niveles de la proteína activada *en* los niños estudiados.

En cuanto a los resultados del rs4880 que se encuentra en el gen *SOD2* y el rs4402960 localizado en el gen *IGF2BP2* los análisis de ExG y GP no presentaron resultados significativos. Esto puede deberse a que el grado de daño en el metabolismo de los niños se encuentra en una etapa inicial y no se ven alteraciones metabólicas puntuales y/o a que los SNPs estudiados no alteren la expresión génica si no que ejerzan alguna otra alteración a lo largo de la síntesis de proteínas. Además, entre las principales limitaciones de este estudio, está el tamaño de la muestra, ya que esto disminuye el poder estadístico, por tanto se pretende ampliar su tamaño, principalmente para el análisis de las secciones ExO, ExP y GP

13. CONCLUSIONES

Los niños con diagnóstico de obesidad presentaron alteraciones en el perfil de lípidos, así como indicios de resistencia a la insulina.

El genotipo TT del rs1800470 se asoció, con niveles elevados de mRNA del gen *TGF-β1*, altos niveles de colesterol total y LDL. Además, los genotipos TT y CT se relacionaron con altos niveles de glucosa.

No se encontró asociación entre el genotipo del rs4402960 y el rs4880 con los parámetros bioquímicos, antropométricos ni con la expresión génica de *IGF2BP2* y *SOD2*.

14. PERSPECTIVAS

- Ampliar la muestra para aumentar el poder estadístico de las pruebas realizadas y replicar los hallazgos encontrados.
- Cuantificar la proteína *TGF-β1* activa en función del nivel de expresión del mRNA.
- Realizar un estudio similar en pacientes diabéticos para observar el comportamiento de la expresión de *TGF-β1* con respecto a los niveles de glucosa, colesterol total y LDL.

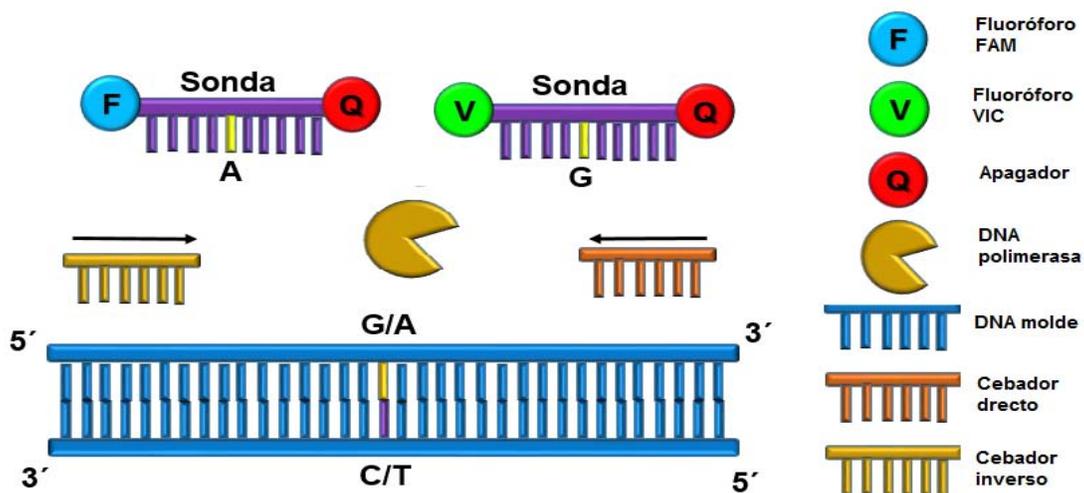
15. GLOSARIO

- **Alelo:** Formas alternativas de un gen que se hallan en el mismo locus de cromosomas homólogos. Los alelos se segregan durante la meiosis y el hijo sólo recibe uno de cada par de alelos de cada progenitor.
- **cDNA:** DNA complementario, sintetizado por una transcripción reversa.
- **Desequilibrio de ligamiento:** Se presenta cuando dos variantes (SNP), tienden a heredarse juntas, por lo que si una variante se presenta en cierto individuo, es muy probable que la otra se presente.
- **Exón:** Secuencia del mRNA que se transcribe
- **Gen:** Secuencia de DNA que constituye la unidad funcional para la transmisión de los caracteres hereditarios.
- **Genoma:** Grupo completo de secuencias en el material genético de un organismo.
- **H₂O- DEPC:** Agua tratada con dietil pirocarbonato, que inhibe las DNAsas y RNAsas que degradan los ácidos nucleicos.
- **Haplotipo:** Combinación particular de alelos de una región definida de un cromosoma. Actualmente se usa para describir combinaciones de SNP u otros marcadores.
- **Intrón:** Secuencia no codificante en el mRNA inmaduro.
- **Locus:** Posición fija en un cromosoma.
- **Nucleótido:** Molécula formada por una base de purina o pirimidina unida al carbón uno' de una pentosa, y con un grupo fosfato unido al carbono 5' o 3' del azúcar.
- **PCR:** Reacción en cadena de la polimeraza, técnica de biología experimental, que replica *in vitro* la duplicación del DNA.
- **Promotor:** Región de DNA que contiene diferentes dominios de unión a factores de transcripción y que determina el lugar donde la RNA polimerasa comienza la transcripción de un gen
- **SNP:** Variación en la secuencia entre individuos causado por un cambio en un solo nucleótido. Responsable de la mayoría de la variación genética entre individuos

ANEXO 2: GENOTIPIFICACIÓN CON SONDAS TAQMAN

La reacción en cadena de la polimerasa mejor conocida como PCR es una técnica de biología molecular, su objetivo es la replicación del DNA *in vitro*. Es decir, producir múltiples copias de una secuencia de DNA existente. Esta técnica puede utilizarse para diversos fines tales como detección de la carga viral, expresión génica, exámenes de paternidad, detección de enfermedades hereditarias, entre otras. Existen dos tipos de PCR, PCR tiempo final y PCR tiempo real. La primera permite obtener un producto final, mientras que la segunda, además de producir dicho producto puede cuantificar su cantidad.

En este estudio, se utilizó esta técnica junto con sondas Taqman para determinar el genotipo de los SNP elegidos (genotipificación). Para ese fin, una PCR necesita de ciertos componentes, los cuales se presentan en la Figura 21



Las sondas Taqman son secuencias de DNA de cadena simple, complementarias a una región específica de DNA, cuentan con un apagador y un fluoróforo. Usualmente las sondas Taqman manejan dos tipos de fluoróforos: VIC y FAM. Cada fluoróforo representa un tipo de alelo de un SNP, como se muestra en la Figura 22. Donde La sonda Taqman VIC representa el alelo G mientras que la sonda Taqman FAM representa al alelo A.

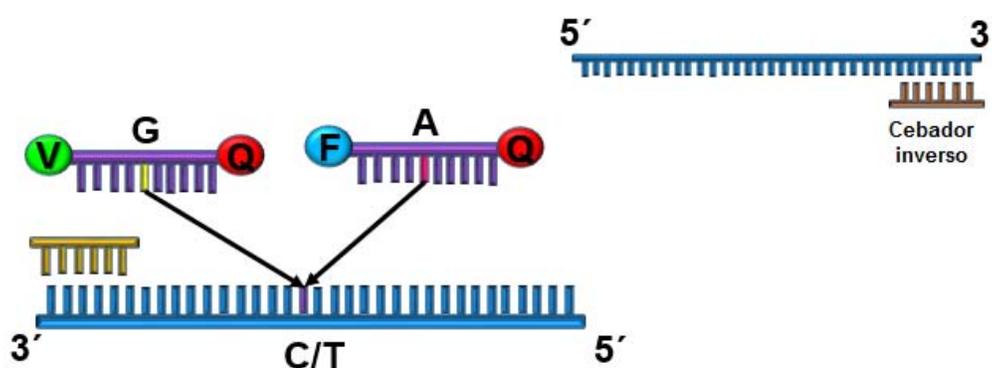


Figura 22. Sondas Taqman (128).

La Tabla 23 contiene los reactivos y sus cantidades utilizados en este trabajo para genotipificación.

Tabla 23. Reactivos para genotipificación (128).

Cantidades de reactivo por reacción	
Reactivo.	Cantidad
Taqman Genotyping Master Mix II con N-uracil glicosidasa (UNG) 2X	3 uL
SNP genotyping (Taqman®) 20X	0.25 uL
DNA	2.5 uL (50 ng/uL)

Los SNP *genotyping* (Taqman), son reactivos comerciales, que además de tener dos tipos de sonda Taqman contienen también cebadores. Los cuales son secuencias de ADN de cadena simple de aproximadamente de 20 bases nitrogenadas y específicos para un gen o una secuencia que se deseé amplificar.

La Taqman Genotyping Master Mix II, contiene la DNA polimerasa y magnesio que funge como un cofactor. Ambos componente junto con los cebadores inicial la replicación del DNA, durante este proceso al encontrar la polimerasa una sonda ya sea VIC o FAM, unida al DNA molde, la rompe, separando el fluoróforo del apagador (ver Figura 23), lo que ocasiona una emisión de fluorescencia, esa señal es captada por el equipo (termociclador) en cada ciclo de la PCR, de esta forma se discrimina el genotipo de una muestra.

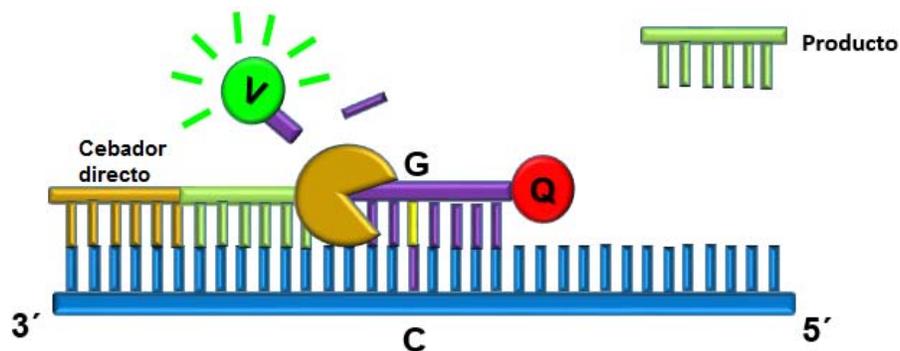


Figura 23. Ruptura de una sondas Taqman por la polimerasa (128).

Así, si se obtiene la señal únicamente para VIC se dice que el sujeto es homocigoto para el alelo al cual VIC representa, asimismo para la sonda FAM. Por el contrario si se detecta la señal para VIC y FAM, se dice que el sujeto es heterocigoto, lo que significa que tiene ambos tipos de alelos.

ANEXO 3: CÁLCULO DE $2^{-\Delta\Delta Ct}$

Para medir la expresión génica, se utilizó el método de cuantificación relativa $2^{-\Delta\Delta Ct}$, el cual utiliza los siguientes componentes para su cálculo (147).

- Muestra problema
- Calibrador
- Gen de interés
- Gen de referencia

La muestra problema se refiere a un fenómeno de interés, es decir, un sujeto con obesidad, niveles altos de glucosa o con el genotipo cualquiera de algún SNP en particular. El calibrador es una muestra que no presenta el fenómeno de interés, considerando los ejemplos anteriores los calibradores adecuados serían los siguientes: un sujeto con peso saludable, niveles normales de glucosa o con el genotipo Y del SNP estudiado.

El método de cuantificación relativa $2^{-\Delta\Delta Ct}$, compara dos fenómenos, en busca de diferencias en la expresión de uno o varios genes de interés en un tejido en particular. Este método utiliza los valores de C_t dados por una PCR. El C_t es el ciclo en el cual la amplificación de una secuencia de DNA rebasa el ruido (umbral) de la fase exponencial de la reacción de PCR. En la Figura 24 se presenta de manera gráfica. La línea verde indica el umbral y los círculos rojos indican los ciclos en los cuales las amplificaciones de una secuencia de ADN (líneas de colores) cruzan dicho umbral.

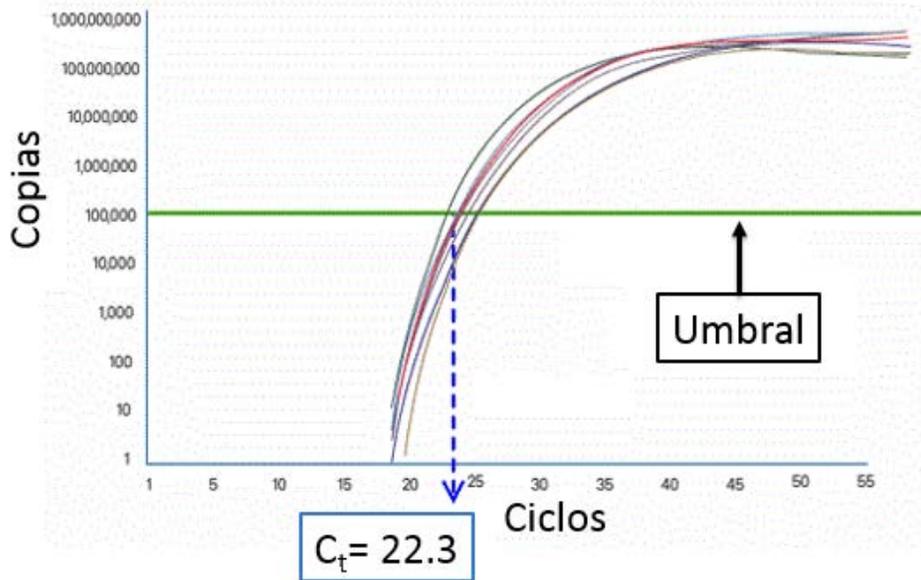


Figura 24. Representación del umbral y C_t en una amplificación por RCR (148).

La fórmula del método $2^{-\Delta\Delta Ct}$ ha sido derivada de la siguiente manera:

La ecuación que describe la amplificación exponencial de una PCR es la siguiente.

$$X_n = X_0 (1 + E_x)^n \dots\dots\dots (1)$$

Donde X_n es el número de moléculas del gen en un ciclo en específico, X_0 es el número de moléculas inicial de la secuencia de interés, E_x es la eficiencia de la reacción de la secuencia de interés y n es el número de ciclos. La eficiencia de la reacción es la reproducibilidad de la amplificación de una secuencia. En la Figura 25 se puede ver de manera gráfica.

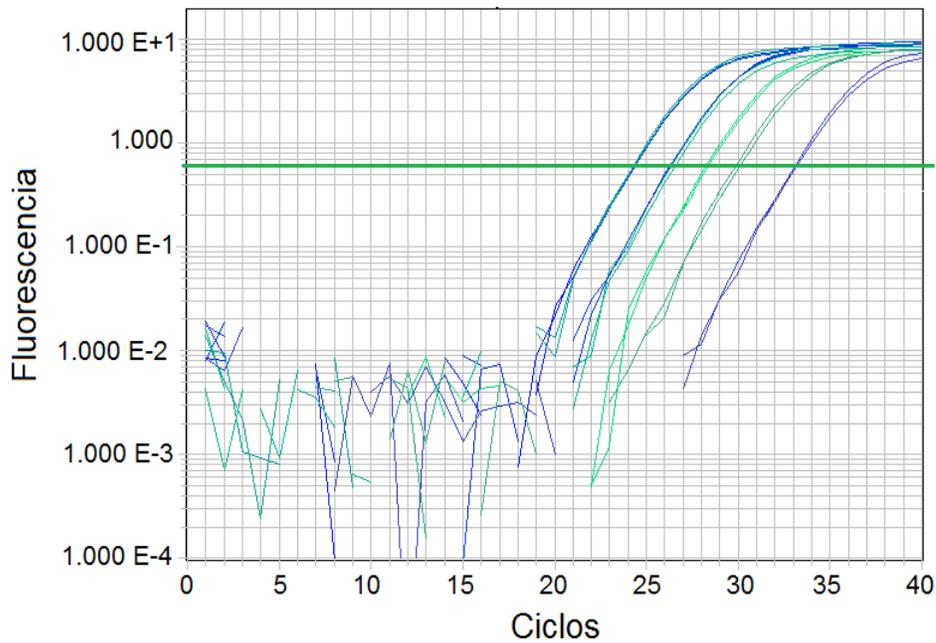


Figura 25. Eficiencia de una reacción en PCR (148).

Como se mencionó este método usa el C_t para calcular el número de moléculas, considerando esto se tiene lo siguiente.

$$X_T = X_O (1 + E_x)^{C_{T,X}} = K_x \dots \dots \dots (2)$$

Donde X_T es el número de moléculas en el C_t de un gen de interés, $C_{T,X}$ es el C_t de la amplificación del gen de interés y K_x es una constante, una ecuación similar se tiene para el gen de referencia.

$$R_T = X_O (1 + E_R)^{C_{T,R}} = K_R \dots \dots \dots (3)$$

Donde R_T es el número de moléculas del gen de referencia, E_R la eficiencia de la amplificación del gen de referencia, $C_{T,R}$ es el Ct de la amplificación del gen de referencia y K_R es una constante.

Para la normalización de la expresión de un gen de interés en un tejido específico se necesita un gen de referencia cuya expresión sea constante en dicho tejido, por lo que la fórmula (2) se divide entre la (3)

$$\frac{X_T}{R_T} = \frac{X_0(1+E_X)^{C_{T,X}}}{R_0(1+E_R)^{C_{T,R}}} = \frac{K_X}{K_R} = K \dots \dots \dots (4)$$

Asumiendo que la eficiencia de ambas reacciones es igual ($E_X = E_R = E$) y sustituyendo por E se tiene lo siguiente.

$$\frac{X_0}{R_0} \times (1 + E)^{C_{T,X} - C_{T,R}} = K \dots \dots \dots (5)$$

Donde al sustituir $\frac{X_0}{R_0}$ por X_N y $C_{T,X} - C_{T,R}$ por ΔC_T se tiene lo siguiente

$$X_N (1 + E)^{\Delta C_T} = K \dots \dots \dots (6)$$

Se despeja a X_N la cual es la cantidad normalizada de moléculas del gen de específico en una muestra de interés.

$$X_N = K (1 + E)^{-\Delta C_T} \dots\dots\dots (7)$$

Por último se divide X_N de la muestra problema entre la X_N de un calibrador

$$\frac{X_{N,q}}{X_{N,cb}} = \frac{K (1+E_X)^{-\Delta C_{T,q}}}{K (1+E_R)^{-\Delta C_{T,cb}}} = (1 + E)^{-\Delta \Delta C_T} \dots (8)$$

La eficiencia de un producto menor a 15 pb; donde la concentración de los cebadores y magnesio han sido optimizadas es cercana a uno por lo que al sustituir queda la siguiente ecuación.

$$Cantidad\ de\ la\ muestra = 2^{-\Delta \Delta C_t} \dots (9)$$

17. REFERENCIAS

- .1. National Institutes of Health. National Heart, Lung, and Blood Institute [Internet]. [citado el 7 de Oct. del 2014]. Disponible en: <http://www.nhlbi.nih.gov/health-spanish/health-topics/temas/obe/#>
2. Kaur J. A comprehensive review on metabolic syndrome. *Cardiology research and practice*. Hindawi Publishing Corporation; 2014 Jan;2014:943162.
3. Van Greevenbroek MMJ, Schalkwijk CG, Stehouwer CD a. Obesity-associated low-grade inflammation in type 2 diabetes mellitus: causes and consequences. *The Netherlands journal of medicine*. 2013 May;71(4):174–87.
4. Texas Heart Institute. Texas Heart Institute [Internet]. 2013 [citado el 14 de Oct. del 2014]. Disponible en: http://www.texasheart.org/HIC/Topics_Esp/Cond/silen_sp.cfm
5. UNICEF. Fondo de las Naciones Unidas para la Infancia [Internet]. [citado el 1 de sep. del 2014]. Disponible en: <http://www.unicef.org/mexico/spanish/17047.htm>
6. Gutiérrez J, Rivera J, Shamah T, Villalpand S, Franco A, Cuevas L et al. Encuesta Nacional de Salud y Nutrición 2012. Resultados Nacionales. Cuernavaca, México: Encuesta Nacional de Salud y Nutrición 2012. Resultados Nacionales; 2012.
7. Wright S, Aronne L. Causes of obesity. *Abdominal Imaging*. Springer-Verlag; 2012;37(5):730–2.
8. Keller MP, Attie AD. Physiological Insights Gained from Gene Expression Analysis in Obesity and Diabetes. *Annual Review of Nutrition*. Annual Reviews; 2010 Jul 1;30(1):341–64.
9. Horan M. Application of serial analysis of gene expression to the study of human genetic disease. *Human Genetics*. Springer-Verlag; 2009;126(5):605–14.
10. Chavez F. Genes implicados en la susceptibilidad a obesidad y genes antiobesidad. *Conceptos clínicos y Terapéuticos*. 2005;63–94.
11. Parra EJ, Below JE, Krithika S, Valladares A, Barta JL, Cox NJ, et al. Genome-wide association study of type 2 diabetes in a sample from Mexico City and a meta-analysis of a Mexican-American sample from Starr County, Texas. *Diabetologia*. 2011 Aug;54(8):2038–46.
12. Hernández J, Martínez J, Valverde V. Polimorfismos reguladores y su participación en la patogenia de enfermedades complejas en la era posgenómica. *Salud Pública de México*. scielosp; 2009. p. 455–62.

13. Marchini J, Howie B, Myers S, McVean G, Donnelly P. A new multipoint method for genome-wide association studies by imputation of genotypes. *Nat Genet.* 2007;39:906–13.
14. Manolio TA. Genomewide Association Studies and Assessment of the Risk of Disease. *New England Journal of Medicine.* Massachusetts Medical Society; 2010 Jul 2;363(2):166–76.
15. Below J, Gamazon E, Morrison J, Konkashbaev A, Pluzhnikov A, McKeigue P, et al. Genome-wide association and meta-analysis in populations from Starr County, Texas, and Mexico City identify type 2 diabetes susceptibility loci and enrichment for expression quantitative trait loci in top signals. *Diabetologia.* 2011 Aug;54(8):2047–55.
16. Cruz M. Candidate gene association study conditioning on individual ancestry in patients with type 2 diabetes and metabolic syndrome from Mexico City. *Diabetes Metabolism Research and Reviews.* 2010;26:261–70.
17. Martínez VL, Valladares A, Cameron E, Chan A, Perera A, Globus R, et al. Admixture in Mexico City: implications for admixture mapping of type 2 diabetes genetic risk factors. *Human genetics.* 2007 Feb;120(6):807–19.
18. Martínez LE, Cruz M, Martínez G, Madrid V, Parra E, García J, et al. A replication study of the IRS1, CAPN10, TCF7L2, and PPARG gene polymorphisms associated with type 2 diabetes in two different populations of Mexico. *Annals of human genetics.* 2011 Sep;75(5):612–20.
19. Ward LD, Kellis M. Interpreting noncoding genetic variation in complex traits and human disease. *Nature biotechnology.* Nature Publishing Group; 2012 Nov;30(11):1095–106.
20. Chen Y, Dawes PT, Packham JC, Matthey DL. Interaction between smoking and functional polymorphism in the TGFB1 gene is associated with ischaemic heart disease and myocardial infarction in patients with rheumatoid arthritis: a cross-sectional study. *Arthritis Research & Therapy.* BioMed Central Ltd; 2012;14(2):R81.
21. Sciarretta S, Ferrucci A, Ciavarella GM, De Paolis P, Venturelli V, Tocci G, et al. Markers of Inflammation and Fibrosis Are Related to Cardiovascular Damage in Hypertensive Patients with Metabolic Syndrome*. *American Journal of Hypertension.* 2007 Jul 1;20(7):784–91.
22. Avendaño LH. Nefrología clínica. *Editorial Medica Panamericana Sa de;* 2008. 407-409 p.
23. Chistiakov D, Nikitin AG, Smetanina S, Bel'chikova LN, Suplotova L, Shestakova M V, et al. The rs11705701 G>A polymorphism of IGF2BP2 is associated with IGF2BP2 mRNA and protein levels in the visceral adipose tissue - a link to type 2 diabetes susceptibility. *The review of diabetic studies : RDS.* 2012;9(2-3):112–22.
24. Ascencio IDJ, Parra EJ, Valladares A, Gómez JH, Kumate J, Escobedo-de-la-Peña J, et al. SOD2 gene Val16Ala polymorphism is associated with macroalbuminuria in

- Mexican type 2 diabetes patients: a comparative study and meta-analysis. *BMC medical genetics*. 2013 Jan;14:110.
25. Tian C, Fang S, Du X, Jia C. Association of the C47T polymorphism in SOD2 with diabetes mellitus and diabetic microvascular complications: a meta-analysis. *Diabetologia*. 2011 Apr;54(4):803–11.
 26. Krebs JE, Goldstein ES, Kilpatrick ST. Lewin. *Genes. Fundamentos*. 2a ed. México: Editorial Medica Panamericana Sa de; 2012.
 27. Hernández A, Vasallo PM, Salido ATE. *Génica*. 1994;XIV:145–62.
 28. Institute B. Genome [Internet]. Estados Unidos. [citado el 16 de Feb. del 2015]. Disponible en: <http://www.broadinstitute.org/education/glossary/genome>
 29. Darnell JE. Variety in the level of gene control in eukaryotic cells. *Nature*. 1982 Jun 3;297(5865):365–71.
 30. Castrillo J. Factores de Transcripción Específicos de Tejido. *Invest y Ciencia*. 1992;64–72.
 31. Ramírez Bello J. Polimorfismos de un solo nucleótido (SNP): implicaciones funcionales de los SNP reguladores (rSNP) y de los SNP-ARN estructurales (srSNP) en enfermedades complejas. *Gaceta Médica de México*. 2013;149:220–8.
 32. Keller MP, Attie AD. Physiological insights gained from gene expression analysis in obesity and diabetes. *Annual review of nutrition*. 2010 Aug 21;30(April):341–64.
 33. Kim S, Parks CG, Xu Z, Carswell G, DeRoo LA, Sandler DP, et al. Association between Genetic Variants in DNA and Histone Methylation and Telomere Length. *PLoS ONE. Public Library of Science*; 2012 Jul 11;7(7):e40504.
 34. Kochi Y, Yamada R, Suzuki A, Harley JB, Shirasawa S, Sawada T, et al. A functional variant in FCRL3, encoding Fc receptor-like 3, is associated with rheumatoid arthritis and several autoimmunities. *Nat Genet*. 2005 May;37(5):478–85.
 35. Fernández-Real JM, Vendrell J, Ricart W, Broch M, Gutiérrez C, Casamitjana R, et al. Polymorphism of the tumor necrosis factor-alpha receptor 2 gene is associated with obesity, leptin levels, and insulin resistance in young subjects and diet-treated type 2 diabetic patients. *Diabetes Care*. 2000 Jun 1;23(6):831–7.
 36. Puga I, Lainez B, Fernández J, Buxadé M, Broch M, Vendrell J, et al. A Polymorphism in the 3' Untranslated Region of the Gene for Tumor Necrosis Factor Receptor 2 Modulates Reporter Gene Expression. *Endocrinology. The Endocrine Society*; 2005 May 1;146(5):2210–20.
 37. Duan J, Wainwright MS, Comeron JM, Saitou N, Sanders AR, Gelernter J, et al. Synonymous mutations in the human dopamine receptor D2 (DRD2) affect mRNA

- stability and synthesis of the receptor. *Human Molecular Genetics*. 2003 Feb 1;12(3):205–16.
38. OMS. Organización Panamericana de la salud [Internet]. 2014 [citado el 1 de Nov. del 2014]. Disponible en: <http://www.who.int/topics/obesity/es/>
 39. Goran MI, Ball GDC, Cruz ML. Obesity and risk of type 2 diabetes and cardiovascular disease in children and adolescents. *The Journal of clinical endocrinology and metabolism*. 2003 Apr;88(4):1417–27.
 40. Krogh R, Plomgaard P, Møller K, Mittendorfer B, Pedersen BK. Influence of TNF-alpha and IL-6 infusions on insulin sensitivity and expression of IL-18 in humans. *American journal of physiology Endocrinology and metabolism*. 2006 Jul;291(1):E108–14.
 41. Rtveldze K, Marsh T, Barquera S, Sanchez Romero LM, Levy D, Melendez G, et al. Obesity prevalence in Mexico: impact on health and economic burden. *Public Health Nutrition*. 2014;17(01):233–9.
 42. Dahl AK, Hassing LB. Obesity and Cognitive Aging. *Epidemiologic reviews*. 2012 Dec 19;35(12):22–32.
 43. Elizondo-Montemayor L, Ugalde-Casas P a, Lam-Franco L, Bustamante-Careaga H, Serrano-González M, Gutiérrez NG, et al. Association of ALT and the metabolic syndrome among Mexican children. *Obesity research & clinical practice. Asia Oceania Assoc. for the Study of Obesity*; 2014;8(1):e79–87.
 44. Karam R. Genética de la obesidad infantil. *Revista Medica del Instituto Mexicano del Seguro Social*. 2014;52:S78–87.
 45. Tan L, Zhu H, He H, Wu K, Li J, Chen X, et al. Replication of 6 Obesity Genes in a Meta-Analysis of Genome-Wide Association Studies from Diverse Ancestries. *PloS one*. 2014;9(5):e96149.
 46. Berulava T, Ziehe M, Klein L, Mladenov E, Thomale J, Ruther U, et al. FTO levels affect RNA modification and the transcriptome. *Eur J Hum Genet. Macmillan Publishers Limited*; 2013 Mar;21(3):317–23.
 47. Kim KH, Song MJ, Chung J, Park H, Kim JB. Hypoxia inhibits adipocyte differentiation in a HDAC-independent manner. *Biochemical and biophysical research communications*. 2005 Aug 12;333(4):1178–84.
 48. Ferranti S, Mozaffarian D, Martha T, Rodríguez AS. Artemisa y consecuencias metabólicas §. 2009;(2):95–108.
 49. Sun S, Ji Y, Kersten S, Qi L. Mechanisms of Inflammatory Responses in Obese Adipose Tissue. *Annual Review of Nutrition*. 2012;32(1):261–86.

50. Kruszynska YT, Olefsky JM, Frias JP. Effect of obesity on susceptibility to fatty acid-induced peripheral tissue insulin resistance. *Metabolism Clinical and Experimental*. Elsevier; 2014 Sep 4;52(2):233–8.
51. Thomson PLM SA. Guía síndrome metabólico. Thomson PL. Colombia; 2009. 9-45 p.
52. Mokdad AH, Ford ES, Bowman B a, Dietz WH, Vinicor F, Bales VS, et al. Prevalence of obesity, diabetes, and obesity-related health risk factors, 2001. *JAMA : the journal of the American Medical Association*. 2003 Jan 1;289(1):76–9.
53. Gami AS, Witt BJ, Howard DE, Erwin PJ, Gami LA, Somers VK, et al. Metabolic Syndrome and Risk of Incident Cardiovascular Events and Death: A Systematic Review and Meta-Analysis of Longitudinal Studies. *Journal of the American College of Cardiology*. 2007 Jan 30;49(4):403–14.
54. Ford ES. Risks for All-Cause Mortality, Cardiovascular Disease, and Diabetes Associated With the Metabolic Syndrome: A summary of the evidence. *Diabetes Care*. 2005 Jul 1;28(7):1769–78.
55. Kohen R, Theriault A, Adeli K. Emergence of the metabolic syndrome in childhood: an epidemiological overview and mechanistic link to dyslipidemia. *Clinical Biochemistry*. 2003 Sep;36(6):413–20.
56. De Ferranti SD, Gauvreau K, Ludwig DS, Neufeld EJ, Newburger JW, Rifai N. Prevalence of the metabolic syndrome in American adolescents: findings from the Third National Health and Nutrition Examination Survey. *Circulation*. 2004 Oct;110(16):2494–7.
57. Cook S, Weitzman M, Auinger P, Nguyen M, WH D. Prevalence of a metabolic syndrome phenotype in adolescents: Findings from the third national health and nutrition examination survey, 1988-1994. *Archives of Pediatrics & Adolescent Medicine*. 2003 Aug 1;157(8):821–7.
58. Weiss R, Dziura J, Burgert TS, Tamborlane W V, Taksali SE, Yeckel CW, et al. Obesity and the Metabolic Syndrome in Children and Adolescents. *New England Journal of Medicine*. Massachusetts Medical Society; 2004 Jun 3;350(23):2362–74.
59. Zimmet P, Alberti G, Kaufman F, Tajima N, Arslanian S, Wong G, et al. El síndrome metabólico en niños y adolescentes: el consenso de la FID. *Diabetes voice*. 2007;52(4):29–32.
60. Zick Y. Insulin resistance: a phosphorylation-based uncoupling of insulin signaling. *Trends in Cell Biology*. Elsevier; 2014 Sep 4;11(11):437–41.
61. Van Obberghen E. Phosphorylation of Insulin Receptor Substrate-1 on Multiple Serine Residues, 612, 632, 662, and 731, Modulates Insulin Action. *Journal of Biological Chemistry*. 1996 May 10;271(19):11222–7.

62. Paz K, Hemi R, LeRoith D, Karasik A, Elhanany E, Kanety H, et al. A molecular basis for insulin resistance: elevated serine/threonine phosphorylation of irs-1 and irs-2 inhibits their binding to the juxtamembrane region of the insulin receptor and impairs their ability to undergo insulin-induced tyrosine phosphorylation. *Journal of Biological Chemistry*. 1997 Nov 21;272(47):29911–8.
63. Liu Y, Paz K, Hershkowitz A, Alt A, Tenenboim T, Sampson S, et al. Insulin stimulates PKC β -mediated phosphorylation of insulin receptor substrate-1 (IRS-1): A self-attenuated mechanism to negatively regulate IRS proteins function. *Journal of Biological Chemistry*. 2001 Jan 29;
64. Haruta T, Uno T, Kawahara J et al. A Rapamycin-Sensitive Pathway Down-Regulates Insulin Signaling via Phosphorylation and Proteasomal Degradation of Insulin Receptor Substrate-1. *Molecular Endocrinology*. 2000;14(6):783–94.
65. Pederson TM, Kramer DL, Rondinone CM. Serine/Threonine Phosphorylation of IRS-1 Triggers Its Degradation: Possible Regulation by Tyrosine Phosphorylation. *Diabetes*. 2001 Jan 1;50(1):24–31.
66. Youngren JF. Regulation of insulin receptor function. *Cellular and Molecular Life Sciences*. Birkhäuser-Verlag; 2007;64(7-8):873–91.
67. Cooke R, Stewart B. *A Colour Atlas of Medical Parasitology : Human Disease Series Transfusion Therapy : Atlas of Gynecologic Atherosclerosis*. 1999;982–4.
68. Davidson JF, Schiestl RH. Mitochondrial Respiratory Electron Carriers Are Involved in Oxidative Stress during Heat Stress in *Saccharomyces cerevisiae* Mitochondrial Respiratory Electron Carriers Are Involved in Oxidative Stress during Heat Stress in *Saccharomyces cerevisiae*. 2001;21(24):8483–9.
69. Beckman B. The Free Radical Theory of Aging Matures. *Physiological Reviews*. 1998 Apr 1;78(2):547–81.
70. Abundis E, Rodríguez M, Bentlakder E. Participación de la mitocondria en el desarrollo de estrés oxidativo en la obesidad. *Bioquímica*. 2005;30:82–9.
71. Henry WL. Perspectives in diabetes. *Journal of the National Medical Association*. 1962;54:476–8.
72. Nishikawa T, Edelstein D, Du XL, Yamagishi S, Matsumura T, Kaneda Y, et al. Normalizing mitochondrial superoxide production blocks three pathways of hyperglycaemic damage. *Nature*. 2000;404(complex II):787–90.
73. Maedler K, Fontana A, Ris F, Sergeev P, Toso C, Oberholzer J, et al. FLIP switches Fas-mediated glucose signaling in human pancreatic beta cells from apoptosis to cell replication. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2002 Jun 11;99(12):8236–41.

74. Lelliott C, Vidal a J. Lipotoxicity, an imbalance between lipogenesis de novo and fatty acid oxidation. *International journal of obesity and related metabolic disorders : journal of the International Association for the Study of Obesity*. 2004;28 Suppl 4:S22–8.
75. Jiménez A, Domínguez V. El papel del estrés oxidativo en la disfunción endotelial de la aterosclerosis. 2010;258–68.
76. Vela Deborah , Maximilian L, Madjid Mohammad Burke Alan, Naghavi Morteza , Willerson T, Ward S, Litovsky S. The Role of Periadventitial Fat in Atherosclerosis An Adipose Subset With Potential Diagnostic and Therapeutic Implications. *Arch Pathol Lab Med*. 2007;131:481–7.
77. Fenster CP, Weinsier RL, Darley-Usmar VM, Patel RP. Obesity, Aerobic Exercise, and Vascular Disease: The Role of Oxidant Stress. *Obesity Research*. Blackwell Publishing Ltd; 2002 Sep 1;10(9):964–8.
78. Van de Voorde J, Pauwels B, Boydens C, Decaluwé K. Adipocytokines in relation to cardiovascular disease. *Metabolism: clinical and experimental*. Elsevier Inc.; 2013 Nov;62(11):1513–21.
79. Conde H, Céspedes LA, Obregón ÁG, Miranda M. Manejo de la angina de pecho en el consultorio del Médico de Familia. *Revista Cubana de Medicina General Integral*. scielocu; 2000. p. 598–605.
80. Aihara K chi, Ikeda Y, Yagi S, Akaike M, Matsumoto T. Transforming Growth Factor- β 1 as a Common Target Molecule for Development of Cardiovascular Diseases, Renal Insufficiency and Metabolic Syndrome. *Cardiology research and practice*. 2010 Jan;2011(Ang II):175381.
81. Annes JP. Making sense of latent TGF β activation. *Journal of Cell Science*. 2003 Jan 15;116(2):217–24.
82. Leask A, Abraham DJ. TGF- β signaling and the fibrotic response. *The FASEB Journal*. 2004 May 1;18(7):816–27.
83. Gibbons GH, Pratt RE, Dzau VJ. Vascular Smooth Muscle Cell Hypertrophy vs . Hyperplasia Autocrine Transforming Growth Factor- β 1, Expression Determines Growth Response to Angiotensin 11. *Journal Clinical of investigation*. 1992;90(August):456–61.
84. Cambien F, Ricard S, Troesch A, Mallet C, Générénaz L, Evans A, et al. Polymorphisms of the Transforming Growth Factor- β 1 Gene in Relation to Myocardial Infarction and Blood Pressure: The Etude Cas-Témoin de l'Infarctus du Myocarde (ECTIM) Study. *Hypertension*. 1996 Nov 1;28(5):881–7.
85. Schultz JEJ, Witt SA, Glascock BJ, Nieman ML, Reiser PJ, Nix SL, et al. TGF- β 1 mediates the hypertrophic cardiomyocyte growth induced by angiotensin II. *The Journal of Clinical Investigation*. The American Society for Clinical Investigation; 2002 Mar 15;109(6):787–96.

86. Leask A. Potential Therapeutic Targets for Cardiac Fibrosis: TGF β , Angiotensin, Endothelin, CCN2, and PDGF, Partners in Fibroblast Activation. *Circulation Research*. 2010 Jun 11;106(11):1675–80.
87. Weigert C, Brodbeck K, Klopfer K, Häring H, Schleicher E. Angiotensin II induces human TGF- β 1 promoter activation: similarity to hyperglycaemia. *Diabetologia*. Springer-Verlag; 2002;45(6):890–8.
88. Laragh JH, Baer L, Brunner HR, Buhler FR, Vaughan JE. Renin, angiotensin and aldosterone system in pathogenesis and management of hypertensive vascular disease. *The American Journal of Medicine*. Elsevier; 2014 Oct 14;52(5):633–52.
89. Rosenkranz S, Flesch M, Amann K, Haeuseler C, Kilter H, Seeland U, et al. Alterations of β -adrenergic signaling and cardiac hypertrophy in transgenic mice overexpressing TGF- β 1. *American Journal of Physiology - Heart and Circulatory Physiology*. 2002 Sep 1;283(3):H1253–62.
90. Valladares A, Angeles J, Rosas M, García J, Utrera D, Gómez R, et al. Association of polymorphisms within the transforming growth factor- β 1 gene with diabetic nephropathy and serum cholesterol and triglyceride concentrations. *Nephrology (Carlton, Vic)*. 2010 Sep;15(6):644–8.
91. Suthanthiran M, Gerber LM, Schwartz JE, Sharma VK, Medeiros M, Marion R, et al. Circulating transforming growth factor-[beta]1 levels and the risk for kidney disease in African Americans. *Kidney Int. International Society of Nephrology*; 2009 Mar 11;76(1):72–80.
92. Yokota M, Ichihara S, Lin T. Association of a T29→C Polymorphism of the Transforming Growth Factor- β 1 Gene With Genetic Susceptibility to Myocardial Infarction in Japanese. *Jurnal of the american heart association*. 2000;2783–7.
93. Fragoso JM, Martínez-Ríos MA, Alvarez-León E, Vallejo M, Peña-Duque MA, Posadas-Sánchez R, et al. The T29C polymorphism of the transforming growth factor- β 1 (TGF- β 1) gene is associated with genetic susceptibility to acute coronary syndrome in Mexican patients. *Cytokine*. 2012 Jun;58(3):380–3.
94. Crobu F, Palumbo L, Franco E, Bergerone S, Carturan S, Guarrera S, et al. Role of TGF- β 1 haplotypes in the occurrence of myocardial infarction in young Italian patients. *BMC Med Genomics*. 2008;7:1–7.
95. Cruz M, Fragoso JM, Alvarez-León E, Escobedo-de-la-Peña J, Valladares A, Juárez-Cedillo T, et al. The TGF-B1 and IL-10 gene polymorphisms are associated with risk of developing silent myocardial ischemia in the diabetic patients. *Immunology letters*. 2013;156(1-2):18–22.
96. Grainger DJ, Heathcote K, Chiano M, Snieder H, Kemp PR, Metcalfe JC, et al. Genetic control of the circulating concentration of transforming growth factor type beta1. *Human molecular genetics*. 1999 Jan;8(1):93–7.

97. Nielsen J, Christiansen J, Lykke-Andersen J, Johnsen a H, Wewer UM, Nielsen FC. A family of insulin-like growth factor II mRNA-binding proteins represses translation in late development. *Molecular and cellular biology*. 1999 Feb;19(2):1262–70.
98. Miralles F, Portha B. Early development of beta-cells is impaired in the GK rat model of type 2 diabetes. *Diabetes*. 2001 Feb 1;50(suppl 1):S84.
99. Parikh H, Lyssenko V, Groop L. Prioritizing genes for follow-up from genome wide association studies using information on gene expression in tissues relevant for type 2 diabetes mellitus. *BMC Medical Genomics*. 2009;2(1):72.
100. Cotsapas C, Prokunina-Olsson L, Welch C, Saxena R, Weaver C, Usher N, et al. Expression analysis of loci associated with type 2 diabetes in human tissues. *Diabetologia*. Springer-Verlag; 2010;53(11):2334–9.
101. Marselli L, Thorne J, Dahiya S, Sgroi DC, Sharma A, Bonner-Weir S, et al. Gene Expression Profiles of Beta-Cell Enriched Tissue Obtained by Laser Capture Microdissection from Subjects with Type 2 Diabetes. *PLoS ONE*. Public Library of Science; 2010 Jul 13;5(7):e11499.
102. Nielsen J, Adolph SK, Rajpert-De Meyts E, Lykke-Andersen J, Koch G, Christiansen J, et al. Nuclear transit of human zipcode-binding protein IMP1. *The Biochemical journal*. 2003 Dec 1;376(Pt 2):383–91.
103. Li X, Allayee H, Xiang AH, Trigo E, Hartiala J, Lawrence JM, et al. Variation in IGF2BP2 interacts with adiposity to alter insulin sensitivity in Mexican Americans. *Obesity (Silver Spring, Md)*. 2009 Apr;17(4):729–36.
104. Maris C, Dominguez C, Allain FH-T. The RNA recognition motif, a plastic RNA-binding platform to regulate post-transcriptional gene expression. *FEBS Journal*. Blackwell Science Ltd; 2005 May 1;272(9):2118–31.
105. Calderari S, Gangnerau M-N, Thibault M, Meile M-J, Kassis N, Alvarez C, et al. Defective IGF2 and IGF1R protein production in embryonic pancreas precedes beta cell mass anomaly in the Goto-Kakizaki rat model of type 2 diabetes. *Diabetologia*. 2007 Jul;50(7):1463–71.
106. Gu T, Horová E, Möllsten A, Seman NA, Falhammar H, Prázný M, et al. IGF2BP2 and IGF2 genetic effects in diabetes and diabetic nephropathy. *Journal of diabetes and its complications*. Elsevier Inc.; 2012;26(5):393–8.
107. Xuan Z, Li H, Yang L, Zhen-Qi W, Yang Y, Li-ning M, et al. The Type 2 Diabetes Mellitus Susceptibility Gene IGF2BP2 Is Associated With Schizophrenia in a Han Chinese Population. *The journal of Clinical Psychiatry*. 2013;74(4):e287–92.
108. Christiansen J, Kolte AM, Hansen TVO, Nielsen FC. IGF2 mRNA-binding protein 2: biological function and putative role in type 2 diabetes. *Journal of molecular endocrinology*. 2009 Nov;43(5):187–95.

109. Bell J, Wächter K, Mühleck B, Pazaitis N, Köhn M, Lederer M, et al. Insulin-like growth factor 2 mRNA-binding proteins (IGF2BPs): post-transcriptional drivers of cancer progression? *Cellular and Molecular Life Sciences*. Springer Basel; 2013;70(15):2657–75.
110. Gamboa MA, Huerta A, Moreno H, Vázquez P, Ordóñez ML, Rodríguez R, et al. Contribution of common genetic variation to the risk of type 2 diabetes in the Mexican Mestizo population. *Diabetes*. 2012 Dec;61(12):3314–21.
111. Jia H, Yu L, Jiang Z, Ji Q. Association Between IGF2BP2 rs4402960 Polymorphism and Risk of Type 2 Diabetes Mellitus: A Meta-analysis. *Archives of Medical Research*. Elsevier; 2014 Oct 13;42(5):361–7.
112. Zelko IN, Mariani TJ, Folz RJ. Superoxide dismutase multigene family: a comparison of the CuZn-SOD (SOD1), Mn-SOD (SOD2), and EC-SOD (SOD3) gene structures, evolution, and expression. *Free Radical Biology and Medicine*. 2002 Aug 1;33(3):337–49.
113. Carolina N. Mitochondrial superoxide dismutase: site of synthesis and intramitochondrial localization. 1973;(13):4793–6.
114. St. Clair DK, Oberley TD, Muse KE, St Clair WH. Expression of manganese superoxide dismutase promotes cellular differentiation. *Free Radical Biology and Medicine*. 1994;16:275–82.
115. Wan XS, Devalaraja MN, St. Clair DK. Molecular structure and organization of the human manganese superoxide dismutase gene. *DNA Cell Biol*. 1994;13:1127–36.
116. Ho YS, Howard AJ, Crapo JD. Molecular structure of a functional gene for manganese-containing superoxide dismutase. *Respir Cell Mol Biol*. 1991;4::278 – .
117. DiSilvestre D, Kleeberger SR, Johns J, Levitt RC. Structure and DNA sequence of the mouse MnSOD gene. *Mammal Genome*. 1995;6:281–4.
118. Jones PL, Kucera G, Gordon H, Boss JM. Cloning and characterization of the murine manganous superoxide dismutase- encoding gene. *Gene*. 1995;153:155–61.
119. Lebovitz RM, Zhang H, Vogel H, Cartwright JJ, L D, Lu N, et al. Neurodegeneration, myocardial injury, and perinatal death in mitochondrial superoxide dismutase-deficient mice. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1996;20:203–9;
120. Church SL, Grant JW, Meese EU, Trent JM. Sublocalization of the gene encoding manganese superoxide dismutase (MnSOD/SOD2) to 6q25 by fluorescence in situ hybridization and somatic cell hybrid mapping. *Genomics*. 1992;14:823–5.
121. Maehara K, Oh-Hashi K, Isobe KI. Early growth-responsive- 1-dependent manganese superoxide dismutase gene transcription mediated by platelet-derived growth factor. *FASEB J*. 2001;15:2025–6.

122. Kuczarski RJ, Ogden CL, Guo SS, Grummer LM, Flegal KM, Mei Z, et al. 2000 CDC Growth Charts for the United States: methods and development. *Vital and health statistics. Series 11, Data from the national health survey.* 2002. 1-190 p.
123. Mejía A, Klünderer M, Yengo L, Meyre D, Aradillas C, Cruz E, et al. Analysis of the contribution of FTO, NPC1, ENPP1, NEGR1, GNPDA2 and MC4R genes to obesity in Mexican children. *BMC medical genetics.* 2013 Jan;14:21.
124. Pupasuite. Pupasuite [Internet]. [citado el 19 de Ene. del 2015]. Disponible en: <http://pupasuite.bioinfo.cipf.es/index.html>
125. Lee PH, Shatkey H. F-SNP: computationally predicted functional SNPs for disease association studies. *Nucleic Acids Research* [Internet]. 2008 Jan 1;36 (suppl 1):D820–4. Disponible en: http://nar.oxfordjournals.org/content/36/suppl_1/D820.abstract
126. Laboratories of NICTA. is-rSNP: in silico regulatory SNP detection [Internet]. [citado el 13 de Sep. del 2014]. Disponible en: <http://bioinformatics.research.nicta.com.au/software/is-rsnp/>
127. Institute B. Haploreg V2 [Internet]. [citado el 19 de Ene. del 2015]. Disponible en: <http://www.broadinstitute.org/mammals/haploreg/haploreg.php>
128. Biosystems A. TaqMan Universal Master Mix II ®. 2011. p. 4.
129. Biosystems A. High Capacity cDNA Reverse Transcription Kits For 200 and 1000 Reactions Protocol. 2010;1–29.
130. UNAM. Unidad de Síntesis y Secuenciación de ADN del Instituto de Biotecnología, UNAM [Internet]. [citado el 14 de Abr. del 2015]. Disponible en: <http://www.ibt.unam.mx/sintesis/>
131. Scientific T. Maxima SYBR Green/ROX qPCR Master Mix (2X). *Synthesis.* 2011;1–9.
132. Cristina M, José F, Nóbrega D, Arlete M, Schimith M. Insulin Resistance in Obese Children. *Diabetes Care.* 2005;28:1–8.
133. Johana L, Devia G, Andrea P, Romero M, Cecilia C, Urrego A, et al. Comparative Study of risk factors related to cardiovascular disease in children from bogotá, colombia and Toluca, México. *Revista de la Facultad de Ciencias Medicas.* 2014;71(2):98–105.
134. Jessup A, Harrell JS. The Metabolic Syndrome : Look for It in Children and adolescents, too! *Clinical Diabetes.* 2005;23(1):26–32.
135. Guerrero F, Aradillas C, Simental LE, Torres ML, Mendoza EDLC, Rosales J, et al. Biochemical characteristics and risk factors for insulin resistance at different levels of obesity. *Pediatrics.* 2013;131:e1211–7.
136. Mamtani, H. Kulkarni, T. D. Dyer, L. Almasy, M. C. Mahaney, R. Duggirala, A. G. Comuzzie, J. Blangero and JEC. Waist circumference is genetically correlated with

- incident Type 2 diabetes in Mexican-American families. *Diabetes Med.* 2012;29(1):997–1003.
137. Rojas R, Aguilar C a., Jiménez A. Optimal cutoff points for the detection of undiagnosed type 2 diabetes, hypertension and metabolic syndrome in Mexican adults. *Salud Publica de Mexico.* 2012;54(1):13–9.
 138. McFarlin BK, Johnson CA, Moreno JP, Foreyt JP. Mexican American Children Have Differential Elevation of Metabolic Biomarkers Proportional to Obesity Status. *Journal of Pediatric Gastroenterology and Nutrition.* 2013;57(6).
 139. Guo J, Lin X, Williams MA, Hamid Q, Georas SN. Yin-Yang 1 regulates effector cytokine gene expression and TH2 immune responses. *Journal of Allergy and Clinical Immunology.* Elsevier; 2014 Nov 25;122(1):195–201.e5.
 140. Yang WS, Chang JW, Han NJ, Lee SK, Park S-K. Spleen tyrosine kinase mediates high glucose-induced transforming growth factor- β 1 up-regulation in proximal tubular epithelial cells. *Experimental Cell Research.* 2012 Sep 10;318(15):1867–76.
 141. Sharma K, Jin Y, Guo J, Ziyadeh FN. Neutralization of TGF- β by Anti-TGF- β Antibody Attenuates Kidney Hypertrophy and the Enhanced Extracellular Matrix Gene Expression in STZ-Induced Diabetic Mice. *Diabetes.* 1996 Apr 1;45(4):522–30.
 142. Michalska M, Iwan-ziętek I, Gniłka W, Dąbrowiecki S, Góralczyk B, Góralczyk K. PAI-1 and a2-AP in Patients with Morbid Obesity. *Adv Clin Exp Med.* 2013;52:801–7.
 143. Lin H-M, Lee J-H, Yadav H, Kamaraju AK, Liu E, Zhigang D, et al. Transforming growth factor-beta/Smad3 signaling regulates insulin gene transcription and pancreatic islet beta-cell function. *The Journal of biological chemistry.* 2009;284(18):12246–57.
 144. Vinagre I, Sánchez JL, Sánchez J, Santos D, Ordoñez J, De Leiva A, et al. Inflammatory biomarkers in type 2 diabetic patients: effect of glycemic control and impact of LDL subfraction phenotype. *Cardiovascular diabetology.* 2014;13:34.
 145. Raju J, Bajaj G, Chrusch J, Bird R. Obese state leads to elevated levels of TGF- β and COX isoforms in platelets of Zucker rats. *Molecular and Cellular Biochemistry.* Springer US; 2006;284(1-2):19–24.
 146. Yudi Purnomo, Yvette Piccart, Tamara Coenen JSP and PJL. Oxidative Stress and Transforming Growth Factor- β 1-induced Cardiac Fibrosis. *Cardiovascular & Hematological Disorders-Drug Targets.* 2013;13(2):165–72.
 147. Livak KJ, Schmittgen TD. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) Method. *Methods (San Diego, Calif).* 2001;25:402–8.
 148. Life technologies. Real-time PCR handbook. Life technologies. 2012;70.