



Universidad Nacional Autónoma de México

Facultad de Estudios Superiores Cuautitlán

Evaluación del estado de metilación de genes relacionados a
perfiles de lípidos en pacientes obesos sometidos a cirugía
bariátrica

T E S I S

Que para obtener el título de:

Licenciada en Bioquímica Diagnóstica

P R E S E N T A:

Claudia Liliana Rosas Giles

Asesor:

Dr. Federico Centeno Cruz

Cuautitlán Izcalli, Estado de México, 2017



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.

Dedicatorias

A mi mamá Luz. Tu esfuerzo, cariño, paciencia y apoyo han hecho esto posible. Gracias por ayudarme a cumplir esta meta y por alentarme a continuar persiguiendo mis sueños.

A Mariana, gracias por siempre escucharme y darme un consejo. También por la ayuda que me has brindado las veces que lo he necesitado.

A Tete, para que no dudes de ti y de lo que podrás lograr algún día, eres capaz de hacer lo que tú quieras, quiero verte llegar muy lejos.

Agradecimientos

A la Dra. Lorena Orozco, por permitirme ser parte de su equipo de trabajo.

A mi asesor el Dr. Federico, por sus enseñanzas, por todo el apoyo que me brindó durante mi estancia en el laboratorio, por la paciencia y por hacerme creer en mi trabajo.

A mis compañeros y amigos del laboratorio: Elahe, Marlen, Pedro, Tulia, Paco, Luis, Ernesto, Paulina, Melissa, Julieta y Miguel, por la ayuda, los consejos y hacer de mi estancia en el laboratorio la más bonita.

A mis sinodales: M.C. Maritere Domínguez Rojas, M.C. Nydia González Angeles, Q.F.B. Alejandro Gutiérrez García y L.B.D. Larisa González Salcedo, por sus comentarios y sugerencias para mejorar este trabajo.

A mis amigos de la facultad, por su valiosa amistad. En especial a Joaquín, por estar en todo momento.

A Leo y Gustavo, por sus consejos y todo el apoyo que me han brindado.

A Fer, por todo el cariño y motivación que me das.



Instituto Nacional de Medicina Genómica MÉXICO

El presente trabajo fue desarrollado en el laboratorio de Inmunogenómica y Enfermedades Metabólicas del Instituto Nacional de Medicina Genómica, bajo la dirección del Dr. Federico Centeno Cruz.

Índice

| | |
|--|----|
| Índice de abreviaturas | 7 |
| Índice de Tablas | 7 |
| Índice de Figuras | 8 |
| 1. Resumen | 9 |
| 2. Introducción | 10 |
| 2.1 Panorama de las enfermedades crónicas en el mundo y en México..... | 10 |
| 2.2 Obesidad..... | 11 |
| 2.3 Dislipidemia..... | 13 |
| 2.4 Dislipidemia y obesidad..... | 15 |
| 2.5 Genética de las enfermedades metabólicas..... | 17 |
| 2.6 Genética de la dislipidemia..... | 18 |
| 2.7 Epigenética de las enfermedades metabólicas..... | 19 |
| 2.8 Epigenética de la dislipidemia..... | 21 |
| 2.9 Epigenética..... | 21 |
| 2.10 Metilación del DNA..... | 23 |
| 2.11 Métodos para medir la metilación del DNA..... | 24 |
| 2.11.1 Técnicas de análisis del genoma completo..... | 25 |
| 2.11.2 Técnicas de análisis región específica..... | 26 |
| 3. Antecedentes | 28 |
| 4. Objetivos | 29 |
| 4.1 Objetivo general..... | 29 |
| 4.2 Objetivos particulares..... | 29 |
| 5. Hipótesis | 29 |
| 6. Estrategia experimental | 29 |
| 7. Materiales y métodos | 31 |
| 7.1 Implementación de la técnica MSP..... | 31 |
| 7.1.1 Selección de genes..... | 31 |
| 7.1.2 Diseño de oligos..... | 31 |
| 7.1.3 Estandarización de condiciones..... | 31 |
| 7.1.4 Prueba de la cuantificación de la metilación..... | 33 |
| 7.1.4.1 Prueba teórica..... | 33 |
| 7.1.4.2 Prueba experimental..... | 33 |
| 7.2 Cuantificación de los niveles de metilación en muestras de tejido..... | 35 |
| 7.2.1 Selección de pacientes..... | 35 |
| 7.2.1.1 Criterios de inclusión..... | 35 |
| 7.2.1.2 Criterios de exclusión..... | 35 |
| 7.2.1.3 Criterios de eliminación..... | 36 |
| 7.2.2 Extracción, cuantificación e integridad del DNA..... | 36 |
| 7.2.3 Conversión de DNA por bisulfito de sodio..... | 36 |
| 7.2.4 Amplificación de DNA convertido por bisulfito por bisulfitoma..... | 36 |
| 7.2.5 Cuantificación de los niveles de metilación en tejido..... | 36 |
| 7.2.6 Análisis estadístico..... | 37 |

| | |
|---|----|
| 8. Resultados | 37 |
| 8.1 Selección de genes..... | 37 |
| 8.2 Diseño de oligos..... | 37 |
| 8.3 Estandarización de condiciones..... | 41 |
| 8.4 Prueba de la cuantificación de la metilación..... | 43 |
| 8.5 Selección de pacientes..... | 48 |
| 8.6 Extracción, cuantificación e integridad del DNA..... | 49 |
| 8.7 Conversión por bisulfito de sodio y amplificación..... | 49 |
| 8.8 Cuantificación de los niveles de metilación en tejido adiposo..... | 50 |
| 9. Discusión | 52 |
| 9.1 Métodos para el análisis de la metilación de una región específica: ventajas y desventajas..... | 53 |
| 9.2 Especificidad y eficiencia de MSP..... | 55 |
| 9.3 Estrategia de cuantificación por qPCR..... | 57 |
| 9.4 Análisis de metilación en genes candidato..... | 58 |
| 10. Conclusiones | 60 |
| 11. Referencias | 61 |

Índice de abreviaturas

AG (Ácidos grasos libres)
ATP (Adenosín trifosfato)
BSP (*Bisulfite Sequencing PCR*)
c-HDL (Colesterol de alta densidad)
c-LDL (Colesterol de baja densidad)
CETP (Proteína transferidora de ésteres de colesterol)
CpG (Citocina unida mediante fosfato a guanina)
Ct (Ciclo umbral)
CT (Colesterol total)
DNMT (DNA metiltransferasas)
DT2 (Diabetes tipo 2)
ECNT (Enfermedades crónicas no transmisibles)
EWAS (Estudio de asociación del epigenoma)
GWAS (Estudio de asociación de genoma completo)
HDAC (Desacetilasas de histonas)
IDL (Lipoproteínas de densidad intermedia)
IMC (Índice de masa muscular)
LH (Lipasa hepática)
LPL (Lipoproteín lipasa)
MAF (Frecuencia del alelo menor)
MBD (Dominios de unión a DNA metilado)
MSP (*Methylation Specific PCR*)
NGS (Secuenciación de nueva generación)
OB (Pacientes pre quirúrgicos)
PLTP (Proteína transferidora de fosfolípidos)
PQX (Pacientes post quirúrgicos)
SAM (S- adenosil metionina)
SNP (Polimorfismo de un solo nucleótido)
TG (Triglicéridos)
VLDL (Lipoproteínas de muy baja densidad)

Índice de Tablas

| | |
|---|----|
| Tabla 1. Clasificación de la obesidad por IMC..... | 12 |
| Tabla 2. Niveles normales de lípidos en la sangre..... | 13 |
| Tabla 3. Clasificación de las dislipidemias de acuerdo a la alteración lipídica predominante..... | 14 |
| Tabla 4. Clasificación fenotípica de las dislipidemias..... | 14 |
| Tabla 5. Clasificación de las dislipidemias secundarias..... | 15 |
| Tabla 6. Ejemplos de genes asociados a enfermedades metabólicas..... | 17 |
| Tabla 7. Ejemplos de procesos metabólicos relacionados a obesidad y diabetes tipo 2 que son regulados por genes que son regulados por mecanismos epigenéticos..... | 20 |
| Tabla 8. Principios de los métodos de análisis de la metilación..... | 24 |

| | |
|--|----|
| Tabla 9. Reactivos para la reacción de PCR en punto final..... | 32 |
| Tabla 10. Condiciones de reacción para la PCR en punto final..... | 32 |
| Tabla 11. Reactivos para qPCR..... | 33 |
| Tabla 12. Condiciones de reacción de la qPCR..... | 33 |
| Tabla 13. Mezcla de DNA..... | 34 |
| Tabla 14. Reactivos para la prueba por MSP..... | 34 |
| Tabla 15. Condiciones de reacción para la prueba por MSP..... | 34 |
| Tabla 16. Reactivos para la cuantificación en tejido por MSP..... | 36 |
| Tabla 17. Condiciones de reacción para la cuantificación en tejido por MSP..... | 36 |
| Tabla 18. Genes asociados a dislipidemia y su función..... | 37 |
| Tabla 19. Secuencia molde para el diseño de oligos..... | 38 |
| Tabla 20. Oligos diseñados..... | 40 |
| Tabla 21. Valores teóricos de metilación y Ct..... | 43 |
| Tabla 22. Parámetros clínicos y bioquímicos de los pacientes..... | 48 |

Índice de Figuras

| | |
|--|----|
| Figura 1. Resumen de las técnicas más relevantes para interrogar la metilación..... | 26 |
| Figura 2. Esquema general de la técnica MSP..... | 27 |
| Figura 3. Estrategia experimental..... | 30 |
| Figura 4. Resultados del programa MethPrimer..... | 40 |
| Figura 5. Productos de amplificación de NR2E1, FTO, NFIX y KCNQ1 con DNA convertido por bisulfito..... | 42 |
| Figura 6. Correlación de los valores teóricos de ΔCt con los de metilación..... | 44 |
| Figura 7. Gráfica de amplificación del gen NR2E1..... | 45 |
| Figura 8. Evaluación de la eficiencia de amplificación..... | 46 |
| Figura 9. Correlación de los valores de metilación calculados con los de ΔCt | 47 |
| Figura 10. Correlación de los valores de metilación conocidos con los valores de metilación calculados..... | 48 |
| Figura 11. Evaluación de la integridad del DNA genómico mediante electroforesis en gel de agarosa al 2 %..... | 49 |
| Figura 12. Evaluación de la amplificación del DNA convertido por bisulfito de sodio mediante electroforesis en gel de agarosa al 2 %..... | 49 |
| Figura 13. Comparación del porcentaje de metilación del gen NR2E1 entre individuos OB y PQX..... | 50 |
| Figura 14. Comparación del porcentaje de metilación del gen NFIX entre individuos OB y PQX..... | 51 |
| Figura 15. Comparación del porcentaje de metilación del gen KCNQ1 entre individuos OB y PQX..... | 51 |
| Figura 16. Comparación del porcentaje de metilación del gen FTO entre individuos OB y PQX..... | 52 |

1. Resumen

En los últimos años se ha visto un aumento en la prevalencia de la obesidad y de las comorbilidades asociadas, las cuales representan un problema grave en la salud pública. Los factores genéticos, juegan un papel en la determinación de la susceptibilidad individual para el aumento de peso y la obesidad, las variantes genéticas identificadas hasta el momento sólo han podido explicar una pequeña parte de la variación clínica en los pacientes. Las crecientes evidencias del papel de la epigenética en el desarrollo de enfermedades metabólicas y como un mediador de las interacciones gen-ambiente involucradas en la obesidad y sus comorbilidades asociadas. Por otra parte, las intervenciones para la reducción de peso, como la dieta, el ejercicio o la cirugía bariátrica, han mostrado que promueven una remodelación de la metilación del DNA. En el presente estudio se midieron los niveles de metilación de los genes NR2E1, NFIX, KCNQ1 y FTO, que están relacionados con el metabolismo de lípidos e índice de masa corporal (IMC), en muestras de tejido adiposo subcutáneo, en 21 pacientes obesos, antes y seis meses después de ser sometidos a cirugía bariátrica. La metilación del DNA se analizó mediante la técnica PCR dependiente de metilación (MSP, del inglés *Methylation Specific PCR*), la cual permite analizar un sitio CpG en particular. Todos los sitios evaluados mostraron un cambio en los niveles de metilación después de la intervención quirúrgica. Aunque los cambios no fueron estadísticamente significativos en esta muestra ($p > 0.05$), se confirma que existe una remodelación de la metilación con la reducción de peso y ésta puede estar asociada a la mejora clínica que presentan estos pacientes. Se sugiere evaluar los cambios en un mayor número de pacientes; así como validar los resultados con algún otro método de mayor sensibilidad.

2. Introducción

Las dislipidemias constituyen un factor de riesgo mayor y modificable para las enfermedades cardiovasculares, que en la actualidad son consideradas como las principales causas de muerte en nuestro país. Este grupo de enfermedades comprenden situaciones clínicas en las que existen concentraciones anormales de colesterol total (CT), colesterol de alta densidad (c-HDL), colesterol de baja densidad (c-LDL) y/o triglicéridos (TG). Las causas de este padecimiento se consideran multifactoriales, en donde el componente genético tiene una participación; sin embargo, los factores ambientales, como el estilo de vida y la dieta, juegan un papel importante en su desarrollo, y se considera que la obesidad es uno de los principales factores de riesgo que contribuyen al desarrollo de la dislipidemia. En nuestro país se considera que alrededor del 70% de la población adulta padece sobrepeso u obesidad, lo que representa un problema de salud pública.

Por otra parte, se ha documentado ampliamente la relación que existe entre la dieta y la regulación del metabolismo de lípidos, por lo que se han realizado esfuerzos para dilucidar la relación que existe entre los mecanismos genéticos y el ambiente en el desarrollo de dislipidemias. Estudios genéticos han identificado genes causantes de dislipidemias primarias y se han encontrado diversas variantes genéticas asociadas al riesgo de desarrollo de dislipidemias y otras alteraciones bioquímicas clínicas.

Recientemente, se ha señalado que los mecanismos epigenéticos son uno de los mediadores principales de la relación gen-ambiente, y se ha señalado que modificaciones en la dieta y en el estilo de vida, así como la reducción de peso son factores que pueden modular el estado de metilación de varios genes relacionados a la salud metabólica. En el laboratorio de Inmunogenómica y Enfermedades Metabólicas del INMEGEN se encontraron varios genes que presentan alteraciones en la metilación del DNA de tejido adiposo en pacientes con obesidad y diabetes. Además, en un estudio posterior, se encontró que después de cirugía bariátrica se presenta una remodelación de la metilación y que existen cambios en genes que se relacionan con la reducción de peso y la mejora en los perfiles de lípidos. El efecto que tiene la remodelación en la mejora clínica necesita evaluarse en un mayor número de pacientes. En el presente trabajo se implementó la cuantificación del estado de metilación por PCR específica de metilación (MSP) y se evaluaron los estados de metilación de cuatro genes candidato, que se han visto correlacionados con la reducción de peso y la mejora en los perfiles de lípidos.

2.1 Panorama de las enfermedades crónicas en el mundo y en México

En el 2014, la Organización Mundial de la Salud (OMS) publicó el informe sobre la situación global de las enfermedades crónicas no transmisibles (ECNT), en el cual se reporta que el número anual de defunciones por enfermedades crónicas ha ido en aumento desde el año 2000, reportando para ese año 31 millones de defunciones, mientras que para el año 2012 se reportaron 38 millones. Las principales causas de muerte son enfermedades cardiovasculares, cáncer, enfermedades respiratorias crónicas y diabetes. Dadas estas cifras, la OMS prevé que el número total anual de defunciones por enfermedades crónicas aumentará a 52 millones en el año 2030.

En México, a principios del siglo pasado, las primeras causas de mortalidad se relacionaban con enfermedades infecciosas y parasitarias, salud materno-infantil y deficiencias alimentarias. Sin embargo, para la segunda mitad de ese siglo, las ECNT comenzaron a cobrar importancia y sus

complicaciones se han convertido en la primera causa de mortalidad en el país (Barquera S., et. al., 2009). Esta transición se ha visto favorecida por cambios en el estilo de vida, en el cual se ven implicadas dietas malsanas e inactividad física, lo que incrementa el riesgo de hipertrigliceridemia e hipertensión, así como de hiperlipidemia y obesidad. La OMS en 2014, estimó que el 77% de las muertes en México se atribuyen a ECNT, en especial enfermedades cardiovasculares y diabetes, siendo la obesidad el principal factor de riesgo.

De las ECNT, se consideran a las enfermedades metabólicas (obesidad, diabetes, síndrome metabólico e hipertensión arterial), como un problema de salud pública al ser las principales causas de atención hospitalaria y de muerte. México es uno de los países con mayor prevalencia a nivel mundial de síndrome metabólico con un 36.8 %; sobrepeso y obesidad 71.3 %; diabetes tipo 2 (DT2) 18 %; e hipertensión arterial 31.5 % (Orozco L., Martínez A.G. y Barajas F.M., 2014).

2.2 Obesidad

La obesidad es una enfermedad crónica, que se caracteriza por la acumulación excesiva de grasa, la cual es resultado de un desequilibrio energético entre las calorías consumidas y gastadas, siendo los cambios en la disponibilidad y características de los alimentos, así como en la reducción de la actividad física, los que han dado lugar a que la ingesta de energía exceda al gasto. Esta tendencia se observa en todos los grupos de edad, en numerosos países. El origen de este padecimiento es multifactorial, en el que se involucra la susceptibilidad genética, el estilo de vida y las características del entorno (Dávila J., et al., 2014).

Los cambios en la alimentación y la actividad física son los principales factores asociados al riesgo de desarrollar obesidad. Estos cambios son consecuencia de la naturaleza cada vez más sedentaria de diversos tipos de trabajo, de las nuevas formas de desplazamiento y del aumento en la disponibilidad de alimentos procesados a bajo costo, que son adicionados con altas cantidades de grasa y azúcar (Barrera A., Rodríguez A. y Molina M.A., 2013).

El origen genético de la obesidad puede atribuirse a modificaciones en uno (monogénicas) o varios genes (poligénicas). Los cambios que ocurren en un solo gen, conducen a formas de aparición precoz de obesidad severa, las cuales son responsables de aproximadamente el 5% de la obesidad mórbida en los humanos (López J.C. y González L.T., 2001). Las más frecuentes son las que ocurren por modificaciones en genes que participan en la vía de la leptina/melanocortina, la cual participa en la regulación del apetito y del gasto de energía. Algunos de los genes que resultan alterados son el gen de la leptina (*LEP*), el receptor de la leptina (*LEPR*), proopiomelanocortina (*POMC*) y el receptor de melanocortina 4 (*MC4R*) (Chávez S. y Sierra M., 2011). Además de los defectos genéticos que afectan el peso corporal, existen numerosos síndromes que presentan obesidad como una de sus manifestaciones clínicas (López J.C. y González L.T., 2001). De éstos, existen aproximadamente 30, que generalmente van acompañados de retardo mental, dismorfias y otras características (Tejero M.E., 2008). Dentro de las formas mejor caracterizadas, se encuentran los síndromes de Prader Willi, Bardet Biedl, osteodistrofia hereditaria de Albright, síndrome de Adler, síndrome de X frágil, síndrome de Cohen, entre otros. Algunos de estos síndromes se asocian a anomalías cromosómicas, y otros son formas monogénicas con efectos pleiotrópicos (Tejero M.E., 2008).

A pesar de que los casos de obesidad monogénica no son frecuentes, su estudio ha permitido identificar las vías metabólicas que se ven alteradas, así como algunos de los genes que participan en ellas, lo que contribuye al estudio de las entidades poligénicas, las cuales son las formas comunes de obesidad. Las entidades poligénicas son resultado de la influencia de la alimentación y actividad física en el genoma, siendo la mala alimentación y la inactividad física los factores que contribuyen a su desarrollo.

Los estudios que se realizan para conocer las causas de la obesidad son importantes, porque permiten contribuir en el tratamiento y prevención ya que, a causa de esta enfermedad, mueren alrededor de 2.8 millones de personas adultas al año a nivel mundial (OMS, 2014). Además, de que el costo social de este padecimiento, en la mayoría de los países, se estima que va del 1 al 3 % del total de gastos de atención médica (de 5 a 10 % en Estados Unidos) y se prevé que estos aumentarán rápidamente en los próximos años, debido a las enfermedades relacionadas con este padecimiento (Bahia L., 2012).

México tiene la prevalencia más alta de obesidad en el mundo, donde aproximadamente 7 de cada 10 adultos padece sobrepeso, 42.6% de los hombres mayores de 20 años, presentan sobrepeso y 26.8% obesidad, en mujeres mayores de 20 años, el 35.5% presentan sobrepeso y el 37.5% obesidad (ENSANUT, 2012).

Para nuestro país se estima que la atención de enfermedades causadas por la obesidad y el sobrepeso tiene un costo anual aproximado de 3500 millones de dólares. El costo directo estimado que representa la atención médica de las enfermedades atribuibles al sobrepeso y la obesidad (enfermedades cardiovasculares, cerebrovasculares, hipertensión, algunos cánceres, diabetes mellitus tipo 2) se incrementó en un 61 % en el periodo 2000-2008, al pasar de 26 283 millones de pesos a por lo menos 42 246 millones de pesos (Secretaría de salud, 2015).

Los indicadores como el índice de masa corporal (IMC) y la medición de la circunferencia de cintura permiten clasificar la gravedad de la enfermedad y el riesgo asociado a ésta (tabla 1). El indicador más utilizado es el índice de masa corporal, el cual se calcula dividiendo el peso (en kilogramos), sobre la talla (en metros al cuadrado).

Tabla 1. Clasificación de la obesidad por IMC

| | IMC (Kg/m²) | Grado de obesidad de acuerdo al IMC | Riesgo de enfermedad |
|-------------|-----------------------------------|--|-----------------------------|
| Peso normal | 18.5 a 24.9 | | - |
| Sobrepeso | 25 a 29.9 | | Alto |
| Obesidad | > 30 | I (30 a 34.9) | Muy alto |
| | | II (35 a 39.9) | Muy alto |
| | | III (IMC > 40) | Extremadamente alto |

Fuente: Dávila J, González JJ, Barrera A. (2015). *Panorama de la obesidad en México*. (p.245). México: Instituto Mexicano del Seguro Social.

El exceso de peso corporal es el principal factor de riesgo para el desarrollo de diversas comorbilidades que afectan la calidad de vida. Entre las principales patologías asociadas a la obesidad están la DT2, hipertensión arterial, enfermedad cerebrovascular, dislipidemia, ciertos

tipos de cáncer, como próstata, mama, colon y endometrio. Todas estas condiciones aumentan los índices de mortalidad y el costo social de la salud (Dávila J., et al., 2014).

Enfermedades como hipertensión arterial y DT2, tienen mayor riesgo de mortalidad o de complicaciones cuando se asocian a dislipidemia, ya que esta condición aumenta el riesgo de aterosclerosis al favorecer el depósito de lípidos en las paredes arteriales, lo que conduce a complicaciones como enfermedad coronaria, infarto agudo al miocardio y enfermedad vascular cerebral. Los pacientes que no padecen diabetes mellitus o hipertensión arterial, pero presentan dislipidemia desde los 20 años de edad, tienen mayor riesgo de sufrir daño coronario o infarto al miocardio por obstrucción arterial debido a la placa de ateroma (Martínez A.F., Chávez R., 2006).

La dislipidemia es una enfermedad que contribuye en la complicación de enfermedades como diabetes y enfermedad coronaria, las cuales son las principales causas de muerte en el país (Canalizo E., et al., 2013). Es por ello que la detección y tratamiento de las alteraciones de los lípidos son clave para la prevención y manejo de dichas enfermedades.

2.3 Dislipidemia

Los lípidos junto con las proteínas y los carbohidratos, son los componentes principales de las células vivas. El colesterol y los triglicéridos son lípidos que se almacenan en el cuerpo y sirven como fuente de energía.

Cuando existe una alteración en la concentración normal de lípidos en sangre, se habla de dislipidemia (tabla 2).

Tabla 2. Niveles normales de lípidos en la sangre

| Lípidos | Niveles (mg/dL) |
|--|------------------------|
| Colesterol total | < 200 |
| Colesterol HDL (del inglés <i>High Density Lipoprotein</i>) | > 35 |
| Colesterol LDL (del inglés <i>Low Density Lipoprotein</i>) | < 130 |
| Triglicéridos | < 150 |

Fuente: Secretaría de Salud (2012). Norma Oficial Mexicana NOM-037-SSA-2002, Para la prevención, tratamiento y control de las dislipidemias. México: Secretaría de Salud.

La dislipidemia es definida como una alteración genética o adquirida de la síntesis o degradación de las lipoproteínas que conduce a un aumento del colesterol total (CT) plasmático, de los triglicéridos (TG) o de ambos (González A.F., 2011).

La dislipidemia puede ser clasificada de acuerdo al fenotipo, a su etiología y al tipo de alteración lipídica predominante. La clasificación por el tipo de alteración predominante es la forma más simple y práctica de clasificar la dislipidemia (tabla 3), a diferencia de la clasificación fenotípica (tabla 4), sin embargo, es importante conocerla porque se usa con frecuencia (González A.F., 2011).

Tabla 3. Clasificación de las dislipidemias de acuerdo a la alteración lipídica predominante

| Nombre | Lípido predominante | Valores (mg/dL) |
|--------------------------------|---|--|
| Hipercolesterolemia | Elevación de Colesterol total | CT > 200 mg/dl, TG < 200 mg/dl y C-LDL ≥ 130 mg/dl |
| Hipertrigliceridemia | Elevación de Triglicéridos | TG > 200 mg/dl, CT < 200 mg/dl y C-LDL < 130 mg/dl |
| Dislipidemia mixta o combinada | Elevación de Colesterol total y Triglicéridos | CT > 200 mg/dl, TG > 200 mg/dl y C-LDL ≥ 130 mg/dl |
| Hipoalfalipoproteinemia | Disminución de C-HDL | C-HDL < 35 mg/dl |

Fuente: Secretaría de Salud (2012). Norma Oficial Mexicana NOM-037-SSA-2002, Para la prevención, tratamiento y control de las dislipidemias. México: Secretaría de Salud.

Tabla 4. Clasificación fenotípica de las dislipidemias

| Fenotipo | Lipoproteínas elevadas | Lípidos aumentados |
|-----------|------------------------|----------------------------|
| Tipo I | Quilomicrones | Triglicéridos |
| Tipo II a | LDL | Colesterol |
| Tipo II b | LDL y VLDL | Colesterol y triglicéridos |
| Tipo III | IDL | Colesterol y triglicéridos |
| Tipo IV | VLDL | Triglicéridos |
| Tipo V | Quilomicrones y VLDL | Triglicéridos |

Fuente: González AF. (2011). *Dislipidemia y factores de riesgo cardiovascular*. (p.2) México: Lancet. IDL (del inglés *Intermediate density lipoproteins*); VLDL (del inglés *Very low density lipoprotein*)

Con base a su etiología, la dislipidemia puede ser primaria, cuando su origen es genético o existe una interacción genética y ambiental, o secundaria, cuando está causada por otras enfermedades, por la acción de ciertas sustancias como fármacos, alcohol, tabaco o por una dieta rica en grasas y carbohidratos (tabla 5).

El origen genético de las dislipidemias primarias puede atribuirse a cambios en un gen (monogénicas), o en varios genes (poligénicas) causando defectos en enzimas, receptores o algunos otros metabolitos que participan en la síntesis y degradación de las lipoproteínas. Las principales dislipidemias primarias son hipercolesterolemia familiar, hiperlipidemia familiar combinada, hipercolesterolemia poligénica, hipertrigliceridemia familiar e hipoalfalipoproteinemia familiar (Secretaría de Salud, 2015). La hipercolesterolemia familiar, se caracteriza por el aumento en los niveles séricos de c-LDL y ocurre por mutaciones en el gen receptor de LDL, *PCSK9* y *APOB* (Companioni O., et al., 2011); la hipertrigliceridemia, se presenta por mutaciones en genes que codifican para proteínas involucradas en el catabolismo de las lipoproteínas ricas en triglicéridos, tales como la enzima LPL, apolipoproteína C2, factor de maduración1 de lipasa, proteína de unión a HDL y apolipoproteína A5 (Schwarzova L., Hubacek J.A. y Vrablik M., 2015). Su prevalencia a nivel poblacional es del 4%, e incrementa del 30-40% en población portadora de cardiopatía coronaria (Barquera S., Campos I., et al. 2009).

Tabla 5. Clasificación de las dislipidemias secundarias

| Triglicéridos elevados | c-LDL elevado | c-HDL bajo |
|---|---|---|
| Enfermedades: bulimia, hipotiroidismo, obesidad, diabetes mellitus mal controlada, uremia, síndrome nefrótico, lupus eritematoso sistémico | Enfermedades: obesidad, hipotiroidismo, anorexia nerviosa, porfiria aguda intermitente, obstrucción biliar extrahepática, síndrome de Werner, disglobulinemia, mieloma múltiple, hepatoma, hipercalcemia infantil | Enfermedades: obesidad, diabetes mellitus mal controlada |
| Fármacos y sustancias: vitaminas liposolubles, diuréticos tiazidicos, furosemida, estrógenos, corticosteroides, cimetidina, fenotiazinas, alcohol | Fármacos y sustancias: vitaminas liposolubles, ciclosporina, amiodarona, retinoides, andrógenos, corticosteroides, progestágenos | Fármacos y sustancias: esteroides anabólicos, progestágenos, retinoides, fenotiazinas, probutol, tabaco |

Fuente: González AF. (2011). *Dislipidemia y factores de riesgo cardiovascular*. (p.4) México: Lancet.

La prevalencia de las dislipidemias observada en la Encuesta Nacional de Salud y Nutrición (ENSANUT) 2006, en adultos de entre 20 y 69 años, fue del 60.5% para hipoalfalipoproteinemia, 43.6% para hipercolesterolemia y 31.5% para hipertrigliceridemia.

2.4 Dislipidemia y obesidad

Durante las últimas décadas, la mortalidad por enfermedades del corazón ha mostrado un incremento constante, hasta llegar a constituirse en la primera causa de muerte en México. Entre las principales causas para el desarrollo de estas enfermedades se encuentra la obesidad, la cual incrementa el riesgo cardiovascular a través de factores metabólicos asociados al aumento en la concentración de triglicéridos (TG) y/o colesterol total (CT), y algunas ocasiones la disminución en los niveles de colesterol HDL (del inglés *High density lipoproteins*).

Para entender cómo es que la obesidad altera el metabolismo de las lipoproteínas es necesario primero conocer el metabolismo normal de las lipoproteínas.

Los TG que provienen de los alimentos, son metabolizados dentro el lumen intestinal y son convertidos en ácidos grasos libres (AG) los cuales son captados por un tipo de células intestinales llamadas enterocitos, en las cuales los AG y el colesterol son transformados en TG y ésteres de colesterol, respectivamente. Los TG y los ésteres de colesterol son empaquetados junto con fosfolípidos y apoproteína B48 para formar quilomicrones, los cuales entran a circulación por el conducto torácico. En el hígado se sintetizan otro tipo de lipoproteínas ricas en TG llamadas lipoproteínas de muy baja densidad (o VLDL), su ensamblaje es casi idéntico al de los quilomicrones, lo que cambia es la apoproteína estructural, que para las VLDL es la B100 (Klop B., et al., 2013).

Los quilomicrones y las VLDL liberan AG después de ser metabolizados, los AG liberados llegan al corazón, músculo esquelético y tejido adiposo, en donde son utilizados para el gasto energético y almacenamiento de energía. Este proceso es regulado por diversas enzimas y proteínas que intervienen como cofactores. La lipoproteinlipasa (LPL) es la principal enzima que participa en la

lipólisis en las lipoproteínas ricas en triglicéridos, la cantidad de AG liberados depende de la actividad de esta enzima (Goldberg I.J., et al., 2009).

Después de que los quilomicrones y las VLDL son metabolizados por la LPL, se forman moléculas más pequeñas, de los quilomicrones se forman remanentes, los cuales son captados por el hígado y son utilizados para la síntesis de las VLDL. Del metabolismo de las VLDL se forman lipoproteínas de densidad intermedia (o IDL), éstas pueden ser captadas por el hígado o seguir siendo metabolizadas para dar lugar a lipoproteínas de baja densidad (o LDL), las cuales tienen alto contenido de ésteres de colesterol.

Los enterocitos y hepatocitos participan dentro del transporte reverso del colesterol al sintetizar apoproteína A-I, la cual es la proteína estructural de las HDL. Las HDL promueven la captación de colesterol de tejidos periféricos, incluyendo la pared arterial y el regreso de colesterol al hígado (Klop B., et al., 2013).

Dentro de la circulación, las partículas HDL también son enriquecidas con ésteres de colesterol por la acción de la proteína transferidora de ésteres de colesterol (CETP) y la proteína transferidora de fosfolípidos (PLTP). En este proceso las HDL adquieren triglicéridos de las lipoproteínas ricas en triglicéridos a cambio de ésteres de colesterol como una consecuencia directa de la acción de CETP. En el hígado, la lipasa hepática hidroliza las HDL asociadas a triglicéridos, mientras que los fosfolípidos inducen la formación de partículas HDL más pequeñas, las cuales pueden contribuir de nuevo con el transporte reverso del colesterol (Klop B., et al., 2013).

La hipertrigliceridemia es una condición característica de las personas que padecen obesidad, este estado conlleva a la formación de moléculas de LDL pequeñas y densas, a un retraso en la remoción de las lipoproteínas ricas en TG y a un aumento en la síntesis de lipoproteínas VLDL (Franssen R., et al., 2011).

La formación de moléculas de LDL pequeñas y densas se da por un aumento en la actividad de la proteína CETP, la cual provoca que el contenido de ésteres de colesterol en las LDL disminuya y el de TG aumente. Las LDL ricas en TG son metabolizadas por la enzima lipasa hepática (LH), dando como resultado moléculas de LDL pequeñas y densas, las cuales son metabolizadas de forma lenta, por lo que permanecen en circulación por varios días lo que favorece su retención en el endotelio vascular (Klop B., et al., 2013).

La alteración en el metabolismo de las lipoproteínas ricas en triglicéridos se da por la disminución en la actividad de la enzima LPL, esto se atribuye a la disminución de los niveles de mRNA de genes que participan en la expresión de LPL, (Klop B., et al., 2013).

El aumento en los niveles de colesterol VLDL se da por la sobre producción hepática de TG y apoproteína B 100, las cuales se sintetizan a consecuencia de los niveles elevados de AG en el organismo (Franssen R., et al., 2011).

La disminución de los niveles de HDL, se atribuye principalmente a la alteración del metabolismo de las lipoproteínas ricas en TG, en donde la excreción retardada de dichas lipoproteínas facilita el intercambio de los ésteres de colesterol de HDL por los TG de las VLDL mediada por la proteína CETP. Al igual que las LDL ricas en TG, las HDL son metabolizadas por la LH y genera moléculas de HDL pequeñas, las cuales pierden afinidad por su apoproteína estructural (A-I), y tienden a ser eliminadas del organismo (Klop B., et al., 2013).

2.5 Genética de las enfermedades metabólicas

Las causas de las enfermedades metabólicas no se conocen con certeza. Sin embargo, la agregación familiar y estudios en gemelos han mostrado que el componente genético juega un papel importante en su desarrollo. Los estudios familiares que examinan la heredabilidad han mostrado que el número de casos que presentan formas de herencia monogénica son muy pocos, siendo las formas comunes las de tipo multifactorial o complejas donde la interacción de varios genes con el ambiente son los que contribuyen en la patogénesis de este tipo de padecimientos (Feero, W.G., et al., 2010).

Los estudios de ligamiento, genes candidato y de asociación, han permitido identificar genes y variaciones en ellos, que están relacionados al riesgo de desarrollar enfermedades metabólicas (tabla 6). De los genes que se han identificado, se sabe que algunos presentan variantes alélicas (polimorfismos) que muestran asociación con la susceptibilidad, gravedad o respuesta al tratamiento de estas patologías. Varios de los polimorfismos asociados al riesgo de desarrollar alguna de las enfermedades metabólicas están cercanos o en genes involucrados en la función del metabolismo, como en las vías de la insulina, leptina-melanocortina, termogénesis, etc. Existen evidencias de que alteraciones en la función de ciertos genes tienen efecto pleiotrópico al causar simultáneamente diferentes alteraciones funcionales en varias estirpes celulares, y que ésta podría ser una de las explicaciones de la presentación simultánea de diferentes enfermedades metabólicas en un mismo individuo, como es el caso del síndrome metabólico (Orozco L., Martínez A.G. y Barajas F.M., 2014).

Tabla 6. Ejemplos de genes asociados a enfermedades metabólicas

| Fenotipo | Gen |
|--------------------------|--|
| Obesidad | <i>FTO, LEP, LEPR, MC4R, SEC16B, ANKRD7, BDNFOS, TMEM18, MC4R, PCSK1, SH2B1, KCTD15, SOCS3, PPARGC1A, MSRA, TFAP2B</i> |
| Diabetes mellitus tipo 2 | <i>SLC16A11, TCF7L2, SLC16A13, CDKAL1, ARAP1, KCNQ1, MADD, KACNJ11, ADIPOQ, SLC30A8, CDKAL1, IGF2BP2, ITGBL1, PPARG, OLFM4</i> |
| Colesterol HDL | <i>ABCA1, APOB, APOC1, HERPUD1, LDLR, RPL28P4</i> |
| Síndrome metabólico | <i>BDNF, ZNF259, VDR, MTHFR, CYP2C19, AKT1</i> |
| Hipertensión | <i>ARHGAP42, ATP2B1, UMOD, LEPR, ADIPOQ</i> |
| Hipertrigliceridemia | <i>ZNF259, LPL, GCKR, GCK, BTN2A1</i> |

Fuente: Orozco L, Martínez AG, Barajas FM. (2014). *Genómica de las enfermedades metabólicas*. (p.8). México: UNAM.

La capacidad para dilucidar la base genética de estas enfermedades continúa evolucionando, gracias a los avances tecnológicos, como son las técnicas de secuenciación de nueva generación, mediante las cuales se han logrado identificar variantes raras o los estudios de asociación de genoma completo (GWAS). Éstos últimos tienen como objetivo establecer la asociación estadística entre polimorfismos y la presencia de fenotipos relacionados con las enfermedades metabólicas. Estos estudios requieren de la genotipificación y evaluación simultánea de una gran cantidad de polimorfismos comunes (entre 100 000 y un millón de estas variantes).

Mediante estos estudios se han logrado identificar diversos loci asociados a enfermedades metabólicas. Para la obesidad se han reportado alrededor de 40 loci que influyen en el IMC encontrando variaciones en genes como *FTO*, el cual está relacionado con problemas en el comportamiento alimenticio y la homeostasis de energía. Una variante común encontrada en el gen *FTO* se ha asociado con el IMC y la DT2 en un estudio en adultos y niños. En este estudio se determinó que 16% de los adultos eran homocigotos para el alelo de riesgo (CC) y estos individuos pesan 3 kg más y tienen un riesgo 1.67 veces mayor para desarrollar obesidad que los individuos que no tienen ese alelo (Herbert A., Gerry N.P. y McQueen M.B., 2006). Este gen codifica para una proteína de la superfamilia de las dioxigenasas y se expresa en numerosos tejidos. Un estudio posterior examinó la asociación entre variantes en los genes *FTO* y el gen *KIAA005*, que se encuentran localizados cerca de *FTO*, en niños con obesidad severa y controles sin sobrepeso. La variante rs9939609 del gen *FTO* se asoció a la presencia de obesidad y variación del IMC en niñas, pero no en niños. Igualmente se encontraron diferencias por sexo en otros fenotipos relacionados con la obesidad. Estas observaciones sugieren la existencia de interacciones entre genotipo y sexo en el desarrollo de la obesidad (Gerken T., Girard Y.C. y Tung C.J., 2007).

En el caso de DT2 se han reportado diversos genes implicados en la etiología de la enfermedad, en los que principalmente se incluyen aquellos que codifican principalmente para moléculas involucradas en algunas de las vías metabólicas de carbohidratos, lípidos y procesos inflamatorios. Las variantes genéticas más replicadas en todo el mundo, asociadas con DT2, se encuentran en genes como *TCF7L2*, *KCNQ1*, *KCNJ11* y *PPARG*. Los polimorfismos en *TCF7L2* se asocian con intolerancia a la glucosa y a un incremento en la regulación de los genes gluconeogénicos, las variantes de *PPARG* están asociadas con las concentraciones de triglicéridos, IMC, adiposidad visceral y resistencia a la insulina, mientras que las del gen *KCNJ11* contribuyen a la diabetes neonatal y DT2 (Orozco L., Martínez A.G. y Barajas F.M., 2014).

El descubrimiento de loci involucrados ha permitido predecir, en algunos casos, los efectos clínicos de estas enfermedades. Por ejemplo, se ha demostrado que personas homocigotas para el alelo (AA) de la variante rs9939609 en el gen *FTO*, tienen un desbalance en la saciedad, por lo que a largo plazo se observa un aumento en el IMC; sin embargo, este efecto se ve atenuado cerca del 27%, en adultos que son físicamente activos, lo que demuestra que los factores ambientales tienen efecto en el riesgo genético (Bell C.G., *et al.*, 2010).

2.6 Genética de la dislipidemia

Los niveles elevados o disminuidos de las lipoproteínas pueden estar relacionados con alteraciones genéticas en un estimado del 40 al 60% de los casos. Este hecho explica el por qué es común encontrar anomalías en los niveles de lípidos en varios miembros de la misma familia. Los niveles elevados de lípidos en el organismo incrementan en un 50% el riesgo de desarrollar enfermedades como aterosclerosis, enfermedades cardiovasculares y otros padecimientos en los que el componente hereditario también participa en su desarrollo, como obesidad, diabetes y síndrome metabólico (Weiss L.A., *et al.*, 2006).

Estudios poblacionales de asociación genética han identificado más de 100 genes que pueden tener un impacto directo en los niveles de lípidos. Entre los genes identificados, existe un grupo previamente conocido y bien caracterizado de genes responsables del desarrollo de dislipidemias monogénicas, las cuales son poco frecuentes. En el resto de los genes se han encontrado variantes,

las cuales tienen un alto impacto en los niveles de lípidos. Ejemplos de variantes de secuencia en genes ligados a los niveles de lípidos en sangre incluyen *APOB*, *APOE* y *PCSK9* con c-LDL; *CETP*, *LIPC* y *LPL* con c-HDL y *APOA5*, *CREB* y *TRIB1* con triglicéridos (Rotondo D. y Davidson J., 2010).

Estudios genéticos en pacientes con infarto agudo al miocardio, en los que han empleado la tecnología de secuenciación de nueva generación (NGS del inglés *Next Generation Sequencing*), han mostrado que la presencia de variantes en el gen *LDLR* elevan hasta cuatro veces el riesgo de padecer este evento en los portadores. Por otro lado, variantes raras en el gen *APOA5*, asociadas con niveles elevados de triglicéridos, dieron como resultado un riesgo tres veces mayor (ERFC, 2009).

Las dislipidemias causadas por el efecto acumulativo de variantes en los genes, surgen como consecuencia de la herencia de múltiples alelos de susceptibilidad (polimorfismos o SNP del inglés *Single Nucleotide Polymorphism*), en donde la susceptibilidad genética no siempre es suficiente para observar una característica determinada (fenotipo), si no que en la mayoría de los casos se requieren de la interacción con factores ambientales, para que el fenotipo se exprese.

2.7 Epigenética de las enfermedades metabólicas

Diversos estudios han demostrado que las enfermedades metabólicas se desarrollan en individuos genéticamente susceptibles. Sin embargo, los factores genéticos identificados hasta ahora sólo explican una pequeña proporción de los casos con enfermedades metabólicas. Ante la evidencia del papel que juegan los factores ambientales en el desarrollo de estas patologías, en los últimos años se ha investigado la importancia de los procesos epigenéticos, como la expresión de micro RNAs (miRNAs), modificaciones de histonas y la metilación del DNA, que pueden estar asociadas a estas enfermedades. En pacientes obesos se han reportado cambios en los patrones de metilación del DNA que afectan la expresión de varios genes que codifican para proteínas que participan en el metabolismo de la glucosa o que están relacionados con el desarrollo de obesidad. De manera similar, hay evidencia de que las personas obesas tienen un patrón de marcas epigenéticas diferentes a las de individuos no obesos, las cuales corresponden a alteraciones en la metilación de genes que participan en procesos como adipogénesis, metabolismo energético, almacenamiento y utilización de lípidos, inflamación, señalización de la insulina y regulación del apetito (Martínez J.A., et al., 2014). Algunos de los genes implicados en la regulación de las principales vías metabólicas que están afectadas por la regulación epigenética se muestran en la tabla 7.

Se ha señalado que los mecanismos epigenéticos son uno de los mediadores principales de la relación gen-ambiente. Entre los factores ambientales que pueden afectar las marcas epigenéticas se encuentran la dieta y la actividad física (Rönn T, et al., 2013). Una alimentación inadecuada puede originar modificaciones epigenéticas que podrían estar implicadas en un incremento del riesgo a sufrir enfermedades metabólicas (Milagro FI, et al., 2013). Los principales factores nutricionales relacionados con la regulación epigenética son los grupos donantes de metilos, en particular los que intervienen en el ciclo de la metionina: metionina, folato, colina, biotina y vitaminas B2, B6 y B12 (Milagro FI, et al., 2013). Estos nutrientes son básicos para mantener los niveles de metilación del DNA y las histonas, siendo la S-adenosil metionina (SAM) la molécula encargada de ceder un grupo metilo a estas macromoléculas. De hecho, una dieta deficiente en grupos donantes de metilo se ha convertido en un modelo habitual de esteatosis hepática que

puede acabar desarrollando cirrosis y hepatocarcinoma, mientras que la suplementación con esas mismas moléculas parece revertir la esteatosis mediante cambios en la metilación de genes clave como la sintasa de ácidos grasos (*FASN*) (Milagro FI, et al., 2013).

En estudios recientes han reportado que la modificación en el estilo de vida, sobre todo a través del ejercicio y la reducción de peso (Barres R., et al. 2012; Barres R., et al. 2013), pueden modificar los patrones de metilación del DNA en tejido muscular y adiposo.

Tabla 7. Genes regulados por mecanismos epigenéticos, que participan en procesos metabólicos relacionados a obesidad y diabetes tipo 2.

| Proceso metabólico | Símbolo del gen | Nombre del gen | Mecanismo epigenético |
|-------------------------------|--|---|---|
| Adipogénesis | <i>CEBPA</i> <i>PPARA</i> | Proteína de unión a potenciador C/EBP α Receptor activado por proliferador de peroxisoma α | Acetilación y metilación de histonas Metilación de DNA |
| Regulación del apetito | <i>LEP</i> <i>MC4R</i> <i>NPY</i> <i>POMC</i> | Leptina Receptor 4 de la melancortina Neuropéptido Y Propiomelancortina | Metilación de DNA |
| Homeostasis del peso corporal | <i>FTO</i> | Asociado a obesidad | Metilación de DNA |
| Homeostasis de la glucosa | <i>ADPOQ</i> <i>INS</i> <i>GLUT4</i> | Adiponectina Insulina Transportador 4 de glucosa que responde a insulina | Metilación de DNA y acetilación de histonas |
| Hipoxia | <i>HIF1A</i> | Factor 1 inducible a hipoxia | Metilación de DNA y acetilación y metilación de histonas |
| Inflamación | <i>IFNG</i> <i>TNF</i> | Interferon γ Factor de necrosis tumoral α | Metilación de DNA |
| Almacenamiento de lípidos | <i>FASN</i> | Sintasa de ácidos grasos | Metilación de DNA |
| Estrés | <i>NR3C1</i> | Receptor de glucocorticoides | Acetilación de histonas |
| Termogénesis | <i>UCP1</i> | Proteína desacoplante 1 | Metilación de DNA |

Fuente: Martínez JA, et al. (2014). *Epigenetics in Adipose Tissue, Obesity, Weight loss and diabetes*. (p.73) España: American Society for Nutrition.

Por otra parte, se ha asociado la exposición a estados adversos en etapas tempranas de la vida o vía intrauterina, con la alteración en la metilación de DNA y este fenómeno se ha propuesto como una explicación a la memoria metabólica. Algunos ejemplos que muestran la importancia del periodo perinatal en el desarrollo de obesidad y diabetes en la edad adulta se han centrado en la alimentación materna durante la gestación o el periodo de lactancia, y en otros factores no nutricionales, como el estrés. Por ejemplo, diversos estudios en humanos y roedores han comprobado que el estrés perinatal (el estrés materno, los bajos niveles de cuidado infantil después del parto y el abuso infantil) afecta a la metilación del DNA del promotor del receptor de glucocorticoides, que se mantiene durante el resto de la vida y se acompaña de una menor

expresión de este gen (Vegiopoulos A. y Herzig S., 2007). En consecuencia, las personas expuestas tienen una mayor respuesta al estrés, lo que lleva a un mayor riesgo de enfermedad. El receptor de glucocorticoides es clave en la regulación de la adiposidad corporal, especialmente la localizada en la zona visceral, y niveles elevados de glucocorticoides se han ligado al desarrollo de diabetes tipo 2 y obesidad.

Varios estudios enfocados en la nutrición perinatal han demostrado que la malnutrición calórica o una dieta baja en proteínas durante el embarazo están implicadas en la programación de la descendencia hacia el desarrollo de obesidad y diabetes. Esta desnutrición induce cambios epigenéticos en las vías hipotalámicas fetales que regulan el metabolismo. Por ejemplo, en un estudio con ovejas que sufrieron desnutrición materna moderada, se redujo la metilación de los promotores de los genes proopiomelanocortina (POMC) y receptor de glucocorticoides (GR) en el hipotálamo fetal, lo que potencialmente puede resultar en una desregulación del balance energético. Estos cambios se asociaron con una menor actividad de la DNA metiltransferasa y una alteración de la metilación y acetilación de las histonas (Begum G., et al. 2012).

Aunque este tipo de estudios son muy difíciles de realizar en humanos, numerosos diseños experimentales en animales están investigando la posibilidad de que las marcas epigenéticas inducidas por un período de estrés o malnutrición puedan ser heredadas por las siguientes generaciones, incrementando el riesgo de éstas de sufrir enfermedades metabólicas.

2.8 Epigenética de la dislipidemia

A pesar de las altas estimaciones de heredabilidad, las variantes reportadas en genes involucrados en la síntesis y metabolismo de lípidos, explican aproximadamente el 10% de la variabilidad observada en los niveles plasmáticos de lípidos (Asselbergs F.W., et al., 2012). Evidencias recientes demuestran que una proporción significativa de la variabilidad genética restante puede atribuirse a procesos epigenéticos como la metilación del DNA.

En estudios en los que han utilizado genes candidato, encontraron que la metilación en varios loci de genes como *APOE*, *LEP*, *ADIPOQ*, *FAIM2*, *IGF2*, *ABCG1*, *LIPC*, *PLTP*, *FABP3*, *MCP1*, *DPP4* y *ABCA1*, está asociada con los niveles de lípidos en plasma (Sayols S., et al., 2016).

Sobre la base de los GWAS, se ha desarrollado una tecnología que evalúa el estado de metilación del genoma llamados estudios de asociación del epigenoma (o EWAS del inglés *Epigenome wide association study*) mediante los cuales han identificado asociaciones entre los niveles de lípidos en sangre y el estado de metilación de genes como *TNNT1*, *DHCR24*, *SREBF1*, *TNIP1*, *ABCG1* y *CPT1A* (Sayols S., et al., 2016).

A pesar de que se ha encontrado evidencia del papel de los procesos epigenéticos, principalmente la metilación del DNA, correlacionan con los perfiles séricos de lípidos, la información sobre la participación de alteraciones en metilación del DNA en el riesgo a desarrollar dislipidemias sigue siendo escasa, por lo que es importante evaluar alteraciones en la metilación en otros genes.

2.9 Epigenética

Los mecanismos genéticos por sí solos no pueden explicar cómo se heredan algunos rasgos celulares. El campo de la epigenética está revelando una base molecular para saber cómo la información hereditaria que no sea la secuencia del DNA puede influir en la función génica.

La epigenética es definida como un sistema de regulación heredable que puede controlar la expresión genética sin alterar la secuencia del DNA.

Existen diversos mecanismos epigenéticos por los cuales es regulada la expresión genética. Hasta el momento, se han identificado más de 20, los cuales incluyen la metilación del DNA, modificaciones post traduccionales de las histonas, silenciamiento génico mediado por RNA no codificantes, complejos de remodelado de cromatina basados en adenosín trifosfato (ATP) y los complejos proteicos Polycomb y Trithorax, entre otros (Mohtat D. y Susztak K., 2010).

Un punto fundamental de la regulación epigenética es la modulación de la estructura de la cromatina, ya que los mecanismos epigenéticos impactan directamente en su organización y mantenimiento. Por lo tanto, es importante conocer su estructura. La cromatina nuclear consiste en complejos formados por DNA y proteínas denominadas histonas (H1, H2A, H2B, H3 y H4). Alrededor de 146 pares de bases se enrollan sobre un octámero de histonas (dos H2A, dos H2B, dos H3 y dos H4) formando el centro de un nucleosoma. Los nucleosomas están separados, como si fueran las cuentas de un collar, por la histona H1 y se van plegando para formar finalmente la cromatina. A su vez, otras proteínas no histonas aportan una mayor condensación para formar un cromosoma. Con técnicas especiales de tinción, la cromatina puede verse al microscopio óptico como heterocromatina (intensamente teñida, por ser muy compacta) o como eucromatina (menos teñida, por ser laxa). Al inicio de la transcripción, la RNA polimerasa es reclutada hasta la región promotora del gen por varias proteínas específicas denominadas factores de transcripción. Para que la transcripción ocurra es necesario que dichas proteínas tengan acceso al promotor del gen a expresar, por lo que su relación con la estructura de la cromatina juega papel importante. La heterocromatina corresponde a DNA transcripcionalmente inactivo, ya que, al ser tan compacta impide el acceso de la RNA polimerasa y los factores de transcripción al promotor. La eucromatina, por su parte, sí permite el acceso de estas proteínas, por lo que es transcripcionalmente activa. Es entonces el estado de la cromatina, activa o inactiva, el que regula en parte la accesibilidad de los factores necesarios para una correcta transcripción y consecuente expresión génica. Una cromatina compacta, no permisiva, llevará al silenciamiento génico. Una cromatina relajada y permisiva (con promotores accesibles a la maquinaria de transcripción) llevará a la expresión del gen (Cavagnari B.M., 2012).

La forma en que los mecanismos epigenéticos modulan la estructura de la cromatina es mediante modificaciones químicas (marcas epigenéticas), las cuales no alteran la secuencia primaria del DNA, pero si pueden alterar la expresión génica en respuesta a señales ambientales. Las marcas epigenéticas son esenciales en diversos procesos biológicos, tales como la regulación de la expresión genética, inactivación del cromosoma X, impronta génica, embriogénesis, gametogénesis, diferenciación celular, silenciamiento de secuencias no génicas (incluyendo transposones, pseudogenes, secuencias repetitivas y virus integrados) que podrían ser perjudiciales para las células si se expresan (Salinas V.H., 2013).

Los cambios en las marcas epigenéticas surgen en parte de fuentes externas del medio ambiente y son importantes para comprender el desarrollo y progresión de ciertas enfermedades, como cáncer, enfermedades neurológicas y DT2. Las modificaciones epigenéticas más relevantes son la metilación del DNA, en los residuos de citosina dentro de los dinucleótidos CpG, las modificaciones post traduccionales de histonas, y el silenciamiento de genes mediado por RNA (Cavagnari B.M.,

2012). Si estas marcas epigenéticas, están cerca de regiones promotoras de genes funcionales, pueden alterar el acceso de la maquinaria transcripcional y por lo tanto la expresión del gen.

En el pasado se creía que la regulación epigenética ocurría exclusivamente durante el desarrollo de células germinales y en embriones preimplantados, además que las marcas epigenéticas se mantenían durante toda la vida. Sin embargo, ahora se sabe que los eventos epigenéticos pueden ocurrir en respuesta a una variedad de señales ambientales durante toda la vida y que las modificaciones no son permanentes (Laker R.C., et al., 2013).

2.10 Metilación de DNA

La metilación del DNA es una marca epigenética heredable, la cual consiste en la transferencia del grupo metilo al carbono 5 de la citosina por acción de las enzimas DNA metiltransferasas (DNMT del inglés *DNA methyltransferases*).

En mamíferos, en células somáticas, la metilación del DNA ocurre aproximadamente del 70 al 80% en dinucleótidos CpG. Los dinucleótidos CpG tienden a agruparse en regiones llamadas islas CpG, las cuales son regiones de más de 200 bases con un alto contenido de guanina (G) y citosina (C). Alrededor del 60% de los promotores de los genes humanos se encuentran en islas CpG y por lo general no están metilados, aunque algunos de ellos (~ 6%) son metilados de forma específica durante el desarrollo temprano o en tejidos diferenciados (Portela A. y Esteller M., 2010), por lo que este proceso es esencial para el desarrollo normal y desempeña un papel muy importante en una serie de procesos clave, como la impronta génica, la inactivación de uno de los cromosomas X en la mujer, en la diferenciación celular, regulación de la expresión genética y estabilidad del genoma (Jin B., Li Y. y Robertson K.D., 2011).

La metilación del DNA está mediada por la familia de enzimas DNMT, que catalizan la transferencia de los grupos metilo de la S-adenosil metionina al DNA. En los mamíferos, se han descrito cinco miembros de la familia DNMT: DNMT1, DNMT2, DNMT3a, DNMT3b y DNMT3L, pero sólo DNMT1, DNMT3a y DNMT3b poseen actividad metiltransferasa (Portela A. y Esteller M., 2010). Las metiltransferasas DNMT3A y DNMT3B, también conocidas como *de novo*, reconocen la secuencia 5' metil-CpG3' y metilan el residuo de citosina de la cadena complementaria, permitiendo así la herencia del estado de metilación de los dinucleótidos CpG. La DNMT1 o de mantenimiento actúa durante la replicación del DNA, copiando los patrones de metilación de la cadena molde a la cadena recién sintetizada (Cavagnari B.M., 2012).

Cuando elementos reguladores de los genes, como regiones promotoras y enhancer, están metiladas hay una supresión de su función, ya que esta modificación impide de forma directa la unión de los factores de transcripción. Otra forma en que la expresión genética puede ser inhibida es a través del reclutamiento de complejos proteicos que se unen específicamente a sitios CpG metilados, los cuales bloquean de forma indirecta la unión de los factores de transcripción al limitar su acceso a los elementos reguladores. Estas proteínas contienen dominios conservados de unión a DNA metilado (MBD, del inglés *methyl binding domain*). La familia de proteínas MBD median la interacción entre el DNA metilado y los componentes de la cromatina, debido a que son capaces de reclutar complejos represores, que incluyen a diversas proteínas, entre ellas a las desacetilasas de histonas (o HDAC), las cuales remueven grupos acetilo de los residuos de lisina de las histonas

H3 y H4, lo que facilita la condensación de la cromatina y limita el acceso de los factores de transcripción a los promotores localizados cercanamente (Laker R.C., et al., 2013).

Los patrones de metilación del DNA son importantes para regular de manera adecuada la expresión de los genes y asegurar un desarrollo normal del ser humano, por lo que su alteración conduce a una des-regulación de los procesos celulares, lo cual se relaciona con varias enfermedades. La metilación aberrante es un fenómeno relativamente frecuente en diversos tipos de cáncer y en investigaciones recientes han mostrado un papel en la etiología de enfermedades complejas como DT2 y enfermedades neuropsiquiátricas (Pidsley R., et al., 2016).

2.11 Métodos para medir la metilación del DNA

El estudio de la metilación del DNA ha sido importante en la investigación de la relación gen-ambiente en enfermedades humanas comunes.

Las tecnologías de análisis de metilación son variadas y permiten evaluar la metilación ya sea del genoma completo o de regiones particulares en determinados genes.

Casi todas las técnicas de análisis de metilación requieren de algún tratamiento dependiente de metilación del DNA antes de la amplificación, hibridación o secuenciación (Laird, P.W. 2010). De los tratamientos disponibles están la digestión con endonucleasas, el enriquecimiento por afinidad y la conversión con bisulfito de sodio. En la tabla 8 se muestran algunas de las técnicas que interrogan la metilación del DNA que utilizan alguno de los pretratamientos que requiere el DNA genómico.

Tabla 8. Principios de los métodos de análisis de la metilación

| Pretratamiento | Análisis | | | |
|-----------------------------------|--|--|--|---|
| | Locus específico | Basado en gel | Basado en chips | Basado en NGS |
| Digestión con endonucleasas | HpaII-PCR | Southern blot RLGS MS-AP-PCR AIMS | DMH MCAM HELP MethylScope CHARM MMASS | Methyl-seq MCA-seq HELP-seq MSCC |
| Enriquecimiento por afinidad | MeDIP-PCR | | MeDIP mDIP mCIP MIRA | MeDIP-seq MIRA-seq |
| Conversión con bisulfito de sodio | MethylLight EpiTYPER MSP-qPCR Pirosecuenciación | Sanger BS MS-SNuPE COBRA MSP | BiMP GoldenGate Infinium | RRBS BS-seq BSPP WGSBS |

AIMS, del inglés *amplification of inter-methylated sites*; BC-seq, conversión por bisulfito seguido de secuenciación; BiMP, del inglés *bisulphite methylation profiling*; BS, secuenciación de bisulfito; BSPP, del inglés *bisulphite padlock probes*; CHARM, del inglés *comprehensive high-throughput arrays for relative methylation*; COBRA, del inglés *combined bisulphite restriction analysis*; DMH, del inglés *differential methylation hybridization*; HELP, del inglés *HpaII tiny fragment enrichment by ligation-mediated PCR*; MCA, del inglés *methylated CpG island amplification*; MCAM, MCA con microarreglos, MeDIP, mDIP y mCIP inmunoprecipitación de DNA metilado; MIRA, del inglés *methylated*

CpG island recovery assay; MMass, del inglés *microarray based methylation assessment of single samples*; MS-AP-PCR, del inglés *methylation-sensitive arbitrarily primed PCR*; MSCC, del inglés *methylation-sensitive cut counting*; MSP, del inglés *methylation-specific PCR*; MS-SNuPE, del inglés *methylation-sensitive single nucleotide primer extension*; NGS, del inglés *next-generation sequencing*; RLGS, del inglés *restriction landmark genome scanning*; RRBS, del inglés *reduced representation bisulphite sequencing*; -seq, seguido de secuenciación; WGSBS, del inglés *whole-genome shotgun bisulphite sequencing*. Modificado de: Laird P.W. (2010).

A parte de la forma de análisis y el pretratamiento que requiere el DNA, otra de las diferencias entre las técnicas que se muestran en la tabla 8 es la escala de análisis de la metilación, es decir, algunas técnicas permiten evaluar la metilación en un locus particular, de regiones diferencialmente metiladas o de todo el genoma.

En la elección del método a emplear para evaluar la metilación, no sólo se debe tomar en cuenta la escala de análisis. También es importante considerar otros factores, como la cantidad y calidad de las muestras de DNA, los requisitos de sensibilidad y especificidad del estudio, la robustez y simplicidad del método, la disponibilidad de herramientas bioinformáticas que permitan analizar e interpretar los resultados, la disponibilidad de equipos y reactivos y el costo.

2.11.1 Técnicas de análisis del genoma completo

La técnica “gold standard” para el análisis de la metilación del genoma completo es la secuenciación de DNA convertido por bisulfito (WGBS del inglés *Whole genome bisulphite sequencing*). Esta técnica se basa en el tratamiento del DNA genómico con bisulfito de sodio, el cual convierte las citosinas no metiladas a uracilos, mientras que las citosinas metiladas permanecen sin cambios. El siguiente paso es la secuenciación del DNA convertido (Pidsley R., et al., 2016), la técnica evalúa aproximadamente el 95% (Stirzaker C., et al. 2010) de los ~ 28 millones de sitios CpG presentes en el genoma humano (Pidsley R., et al., 2016). Ésta técnica se ha aplicado con éxito en diversos tejidos biológicos y líneas celulares. Sin embargo, el costo elevado de la técnica y la dificultad del procesamiento de los datos hacen de la técnica la menos factible para estudios de cohortes muy grandes (Pidsley R., et al., 2016).

Otras técnicas relevantes que permiten obtener valores de metilación a gran escala son MeDIP-seq, RRBS, LUMA (del inglés *LUMinometric Methylation Assay*), MeDIP-seq, BC-seq y los chips de metilación, que hasta ahora los de mayor cobertura son dos, el EPIC BeadChip que analiza aproximadamente 850 mil sitios CpG, y el BeadChip 450K que analiza aproximadamente 450 mil sitios CpG.

En la figura 1 se muestra un esquema general de las técnicas más utilizadas en el análisis de la metilación, señalando el costo, cobertura que tienen y la cantidad de muestra de DNA genómico que requieren.

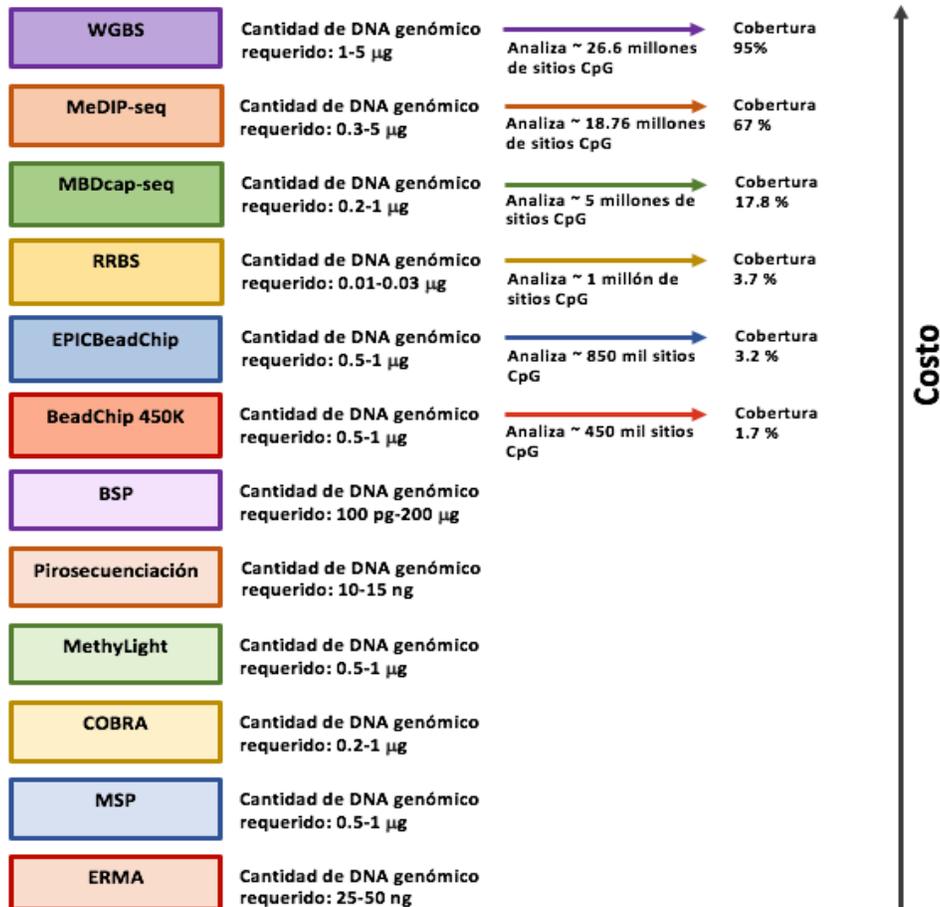


Figura 1. Resumen de las técnicas más relevantes para interrogar la metilación. En los cuadros de color, de lado izquierdo se indica el nombre de las técnicas. Frente a ellas se señala la cantidad de DNA genómico necesaria para realizar cada técnica y el número aproximado de sitios CpG que pueden ser analizados por las técnicas de análisis a gran escala. El costo de cada técnica es aproximadamente proporcional a la cantidad de datos necesarios para analizarlos y de la cobertura del genoma. En el caso de las técnicas que analizan regiones específicas, su costo se basa en los reactivos que requiere y la tecnología de análisis. Modificado de: Stirzaker C., et al. (2010).

2.11.2 Técnicas de análisis región específica

La técnica “gold estándar” para interrogar regiones específicas en el DNA es BSP (del inglés *Bisulfite Sequencing* PCR), ésta técnica facilita la identificación y cuantificación de la metilación del DNA a una sola resolución de nucleótidos. Tras la amplificación por PCR, el uracilo se amplifica como timina mientras que los residuos 5-metil citosina permanecen como citosinas, lo que permite distinguir a los CpG metilados de los CpG no metilados por la presencia de un residuo de citosina frente a la timina durante la secuenciación (Wang J., et al. 2009). Sin embargo, su desarrollo es costoso comparado con otras técnicas que permiten obtener los mismos resultados tales como los métodos Ms-SNuPE, COBRA, MethyLight, Pirosecuenciación, la técnica ERMA (del inglés *Enzymatic Regional Methylation Assay*) y MSP.

La técnica PCR específica de metilación (MSP) ha sido utilizada en el análisis cualitativo y cuantitativo del estado de metilación de regiones específicas del DNA. Al igual que las técnicas

anteriores, ésta requiere del tratamiento inicial con bisulfito de sodio y posterior amplificación por PCR, utilizando dos pares de oligonucleótidos diferentes, uno que amplifica sólo cuando el sitio a evaluar está metilado (oligo M) y otro que amplifica cuando no está metilado (oligo U) (ver figura 2). Esto es posible por la composición de los oligos, donde el oligo M tiene un alto contenido de G/C (guanina y citosina) y el oligo U un alto contenido de T/A (timina y adenina).

Para su diseño, se debe considerar que la secuencia de DNA está convertida por bisulfito, por lo que se utilizan programas diferentes a los convencionales. Un ejemplo de ellos es el programa MethPrimer, que realiza y facilita el diseño de oligonucleótidos con la secuencia convertida (Li y Dahiya, 2002).

La MSP puede ser una técnica cuantitativa, si el método de la amplificación de las muestras es por qPCR (del inglés quantitative PCR).

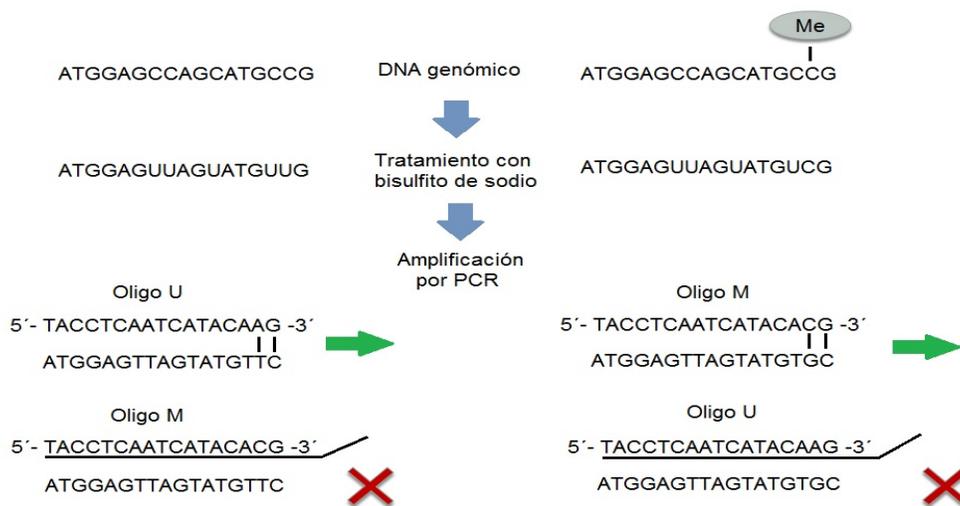


Figura 2. Esquema general de la técnica MSP. En la evaluación del estado de metilación de un sitio CpG en particular se pueden tener dos posibilidades, que el sitio CpG de interés esté metilado (lado izquierdo) o que no lo esté (lado derecho). Después del tratamiento del DNA con bisulfito las citosinas que están no metiladas son convertidas a uracilos, mientras que las citosinas metiladas permanecen sin cambios. La forma en que la técnica evalúa el estado de metilación del sitio CpG de interés es utilizando oligos específicos que en su extremo 3' contienen al sitio CpG a evaluar, en donde el oligo M en esta posición puede tener las bases G o C, mientras que el oligo U puede tener las bases A o T. La amplificación de la secuencia sólo se llevará a cabo por complementariedad de bases, por lo que el oligo M no podrá amplificar con la secuencia no metilada y viceversa.

3. Antecedentes

Se ha demostrado que la obesidad es un factor de riesgo para el desarrollo de comorbilidades como DT2, hipertensión, enfermedades cardiovasculares, dislipidemia, artritis, apnea obstructiva de sueño y cáncer, que en conjunto son responsables de más de 2.5 millones de muertes por año en el mundo.

Los riesgos de salud asociados a la obesidad pueden mejorar con la reducción de peso. El tratamiento para la obesidad se basa en una adecuada alimentación y en el incremento en la actividad física. Sin embargo, la pérdida de peso mediante estas medidas no siempre es exitosa por la falta de apego. Es por ello que el tratamiento quirúrgico como la cirugía bariátrica, ha logrado implementarse con éxito en la reducción de peso a largo plazo, en pacientes con un IMC > 35 kg/m². Alcanzando una mejora en las alteraciones metabólicas asociadas a la obesidad, riesgo cardiovascular y mortalidad.

El bypass gástrico Roux en Y es el procedimiento bariátrico más utilizado para el tratamiento de la obesidad mórbida, el cual combina los procedimientos restrictivos y malabsortivos, los cuales inducen la pérdida de peso al desviar el paso de los nutrientes al intestino delgado y dirigirlos directamente al íleon distal produciendo malabsorción (Buchwald, H., et al., 2004).

Existen múltiples estudios que han documentado la mejora clínica en enfermedades metabólicas después de la cirugía bariátrica. El efecto benéfico de la cirugía bariátrica sobre la DT2 es uno de los más observados. En el caso de la dislipidemia se ha reportado una disminución en los niveles de triglicéridos y c-LDL y un incremento en los valores de c-HDL (Zlabek J.A., et al., 2005).

En el laboratorio de Inmunogenómica y Enfermedades Metabólicas del INMEGEN se encontraron varios genes que presentan alteraciones en la metilación del DNA en tejido adiposo de pacientes obesos diabéticos. En un estudio posterior, se encontró que después de cirugía bariátrica se presenta una remodelación de la metilación y que existen cambios en genes que se relacionan con la reducción de peso y la mejora en los perfiles de lípidos. El efecto que tiene la remodelación en la mejora clínica necesita evaluarse en un mayor número de pacientes, por lo que en el presente trabajo se implementó la cuantificación del estado de metilación por PCR específica de metilación (MSP) para evaluar el estado de metilación de los genes *NR2E1*, *NFIX*, *KCNQ1* y *FTO*, los cuales se vieron relacionados con la mejora en la salud metabólica y con la reducción de peso.

4. Objetivos

4.1 Objetivo general

Evaluar el estado de metilación de los genes *NR2E1*, *NFIX*, *KCNQ1* y *FTO* mediante la técnica MSP, en tejido adiposo subcutáneo de pacientes obesos antes y después de ser sometidos a cirugía bariátrica.

4.2 Objetivos particulares

- Implementar la técnica de PCR específica de metilación (MSP) para loci relacionados a reducción de peso y perfiles de lípidos.
- Evaluar el estado de metilación de los genes seleccionados en muestras de DNA de pacientes obesos sometidos a cirugía bariátrica
- Determinar si hay una remodelación de los valores de metilación, evaluados por MSP, después de la cirugía bariátrica.

5. Hipótesis

El cambio en el estado de metilación de los genes *NR2E1*, *NFIX*, *KCNQ1* y *FTO*, después de la cirugía bariátrica, está relacionado con la reducción de peso y la mejora en los perfiles de lípidos de los pacientes.

6. Estrategia experimental

Antes de cuantificar los niveles de metilación en tejido, fue necesario implementar la técnica de MSP. En el diagrama que se muestra en la figura 3, se describe de forma resumida la estrategia que se siguió para implementar la técnica MSP y para cuantificar los niveles de metilación en las muestras de los pacientes, de la cual se profundizará más adelante.

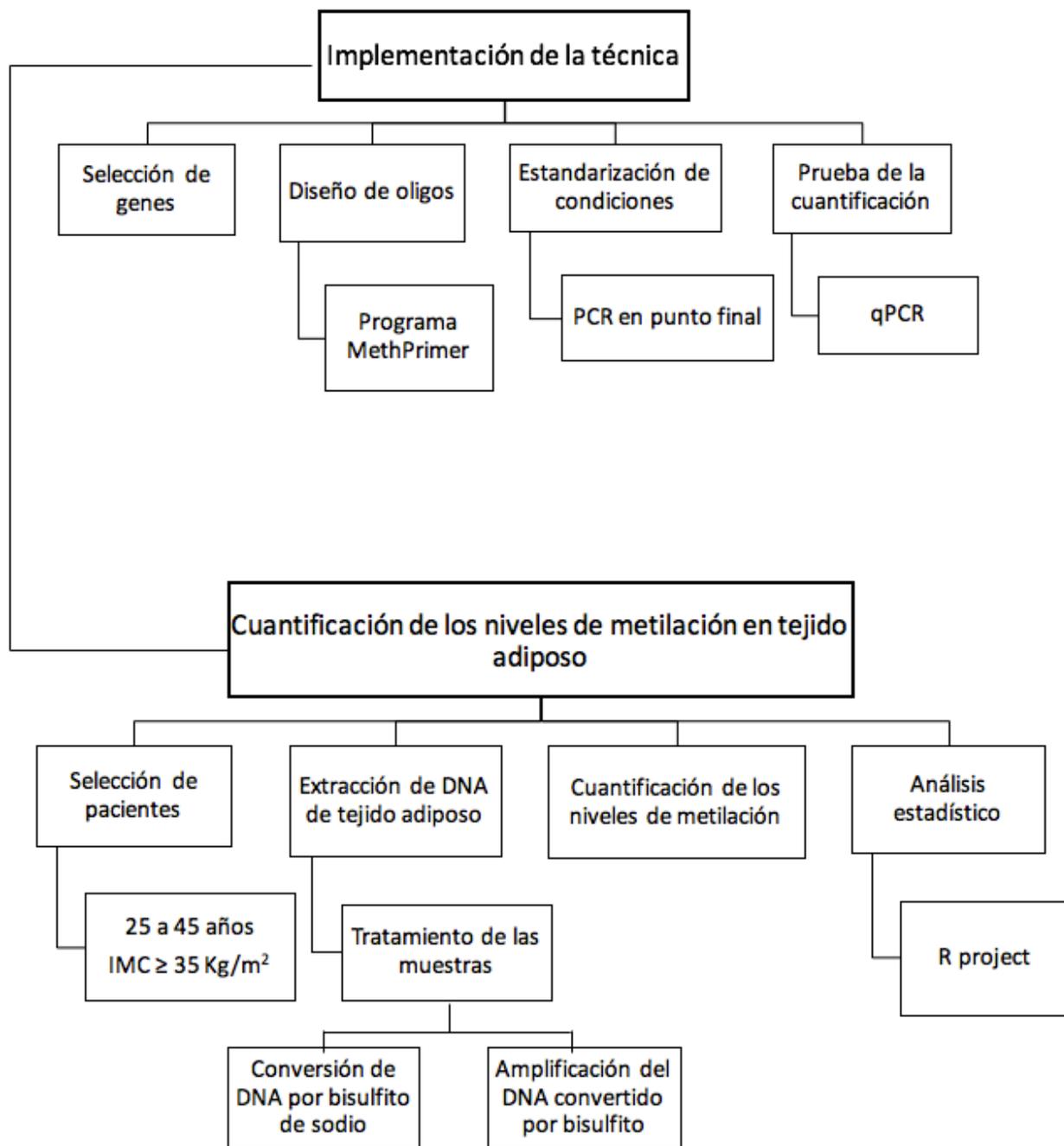


Figura 3. Estrategia experimental.

7. Materiales y métodos

7.1 Implementación de la técnica MSP

7.1.1 Selección de genes

En un trabajo previo, realizado en el Instituto Nacional de Medicina Genómica, analizaron la metilación del DNA, en tejido adiposo subcutáneo de pacientes obesos antes y después de ser sometidos a cirugía bariátrica y encontraron cambios en la metilación después de la intervención en varios genes, los cuales estuvieron relacionados con el metabolismo de lípidos e IMC y presentaron correlación con valores de CT, TG, c-HDL, c-LDL e IMC (Sánchez EC., 2017). De esos genes, se eligieron a los que tuvieron la mejor correlación con dichos parámetros (*NR2E1*, *NFIX*, *KCNQ1* y *FTO*), para ser evaluados por MSP.

7.1.2 Diseño de oligos

Para el diseño de oligos, primero se delimitó la secuencia genética. Para ello se utilizó la secuencia genética de las sondas del microarreglo de metilación, con la cual se hizo un alineamiento en BLAST, con la finalidad de ubicar la posición de la secuencia de la sonda en la del gen. Una vez obtenida esta información, desde el programa BLAST se accedió a la base de datos GenBank, para poder delimitar una secuencia de aproximadamente 700 pb alrededor del sitio CpG.

Posteriormente, se descartaron zonas con variantes genéticas. Para esto, la secuencia fue analizada con la herramienta Graphics de GenBank, en la cual se indicó que en la nueva secuencia se buscaran SNP (del inglés *Single Nucleotide Polymorphism*) que tuvieran un valor de MAF (del inglés *Minor Allele Frequency*) mayor a 0.01.

Una vez que se identificaron los SNP en la secuencia, ésta se introdujo al programa MethPrimer, al cual se le especificó que el diseño de oligos es para la técnica MSP, para la cual es necesario el diseño de dos pares de oligonucleótidos, uno de ellos es específico para la amplificación del locus metilado (oligo M) y el otro para el no metilado (oligo U). Esto es posible porque el programa considera la conversión por bisulfito del DNA, por lo que las citosinas metiladas las mantiene como citosinas y las no metiladas las convierte en timinas.

El programa arroja cinco posibles resultados. Para la selección del par de oligos se consideró, que el sitio CpG a evaluar se encontrara en el extremo 3' de los oligos, que el tamaño del amplicón fuera de 150-300 pb, que ninguno de los oligos cayera en algún SNP, que la temperatura de alineamiento fuera de aproximadamente 60° C y que la diferencia de temperatura entre ambos oligos no fuera mayor a los 5° C.

Los oligos se mandaron sintetizar con la compañía IDT (Integrated DNA Technologies).

7.1.3 Estandarización de condiciones

Para probar la eficiencia de amplificación con los oligos diseñados, primero se probaron los oligos por PCR en punto final. La cantidad de reactivos está establecida para un volumen de reacción de 25 µL. La cantidad de oligos y muestra se señalan en la tabla 9 y las condiciones de reacción en la tabla 10.

Tabla 9. Reactivos para la reacción de PCR en punto final

| Reactivos | Cantidad para una reacción |
|--------------------------|----------------------------|
| 10X Buffer | 2.5 µL |
| MgCl ₂ [25mM] | 2 µL |
| dNTP's [2.5mM] | 2 µL |
| Oligo F [10µM] | 1 µL |
| Oligo R [10µM] | 1 µL |
| DNA [100 ng/µL] | 1µL |
| bsDNA [164.1 ng/µL] | 2 µL |
| TaqPolimerasa [5U/µL] | 0.25 µL |
| H ₂ O | 15.25 µL |

Oligo F: Forward; Oligo R: Reverse; bsDNA: DNA convertido por bisulfito. * Para cada tipo de muestra se hizo una mix de reacción que llevó los mismos reactivos y la misma cantidad de cada uno de ellos.

Los reactivos que se emplearon para la PCR, son de la marca Applied Biosystems, se usó la enzima AmpliTaq™ Gold DNA Polymerase with Buffer II and MgCl₂ de Roche.

Para las pruebas y estandarización de la amplificación se utilizó DNA de muestras de sangre. La muestra fue extraída por venopunción, utilizando tubos Vacutainer® que contienen como anticoagulante EDTA. La muestra fue procesada de forma inmediata.

Para la extracción de DNA se utilizó Gentra Puregene Blood Kit de Qiagen, siguiendo el protocolo establecido por el proveedor (Gentra Puregene Handbook 12/2014).

Una porción del DNA fue tratada con bisulfito de sodio. Este procedimiento se describirá más adelante.

Tabla 10. Condiciones de reacción para la PCR en punto final

| Paso | Temperatura | Tiempo | Ciclos |
|-------------------|-------------|-------------|--------|
| Hot start | 95º C | 10 minutos | 1 |
| Desnaturalización | 95º C | 30 segundos | 35 |
| Alineamiento | 65º C | 45 segundos | |
| Extensión | 75º C | 30 segundos | |
| Extensión final | 75º C | 10 minutos | 1 |
| Enfriamiento | 4º C | ∞ | - |

El termociclador que se utilizó fue GeneAmp PCR System 9700 de Applied Biosystems.

Los resultados de la PCR se evaluaron por electroforesis en gel de agarosa al 2% (UltraPure™ Agarose de invitrogen), el buffer que se utilizó fue TBE 1X. Se mezcló 1µL de la muestra amplificada, 2 µL de buffer de carga y 3 µL de GelRed (Biotium Inc.). Las condiciones de electroforesis fueron 50 minutos, 90 Volts (fuente de poder BioRad®, No. de serie 1704401). El gel se visualizó en un fotodocumentador MultiDoc-It™ 125 Imaging System M-20V (UVP). Las bandas se compararon con el marcador de peso molecular 1Kb Plus Ladder™ de ThermoFisher.

Los resultados obtenidos por PCR en punto final se probaron por PCR en tiempo real (qPCR). La cantidad de reactivos y muestra de la qPCR en tiempo real se muestran en la tabla 11 y las condiciones de reacción en la tabla 12. El volumen final de la reacción fue de 25 μ L. Las reacciones se realizaron por triplicado.

Tabla 11. Reactivos para qPCR

| Reactivos | Cantidad para una reacción |
|----------------------------|----------------------------|
| Master mix Sybr Green (2X) | 12.5 μ L |
| ROX (50X) | 0.5 μ L |
| Oligo F [10 μ M] | 1 μ L |
| Oligo R [10 μ M] | 1 μ L |
| AmbsDNA | 0.5 μ L |
| H ₂ O | 9.5 μ L |

AmbsDNA: DNA convertido por bisulfito y amplificado

Para la reacción se utilizó el kit Sybr Fast qPCR Master Mix Universal Kit, de Kapa Biosystems, utilizando ROX como referencia pasiva.

La amplificación del DNA convertido por bisulfito se describirá más adelante.

Tabla 12. Condiciones de reacción de la qPCR

| Paso | Temperatura | Tiempo | Ciclos |
|-------------------|-------------|-------------|--------|
| Hot Start | 95° C | 10 minutos | 1 |
| Desnaturalización | 95° C | 30 segundos | 40 |
| *Alineamiento | 65° C | 45 segundos | |

* En este paso se indicó al equipo que capturara la fluorescencia. El equipo que se utilizó fue Quantum Studio 3 de Applied Biosystems.

7.1.4 Prueba de la cuantificación de la metilación

7.1.4.1 Valores teóricos

Para la construcción de la tabla con valores teóricos de Ct que corresponden a los valores de metilación, se partió del principio de que a un valor de metilación del 50% (0.5), el valor de Ct para la amplificación con los oligos M y U sería el mismo, por lo que el valor de Δ Ct sería igual a cero. Por cada disminución del valor de metilación, valor de Ct de oligo M tendrá un incremento proporcional, mientras que reducirá el valor de Ct de del oligo U; por el contrario, el aumento en el valor de metilación produce una reducción del valor de Ct del oligo M y un aumento del valor del Ct del oligo U.

7.1.4.2 Prueba experimental

Se construyó un DNA artificial de valores de metilación conocidos, los cuales iban de 0% metilado a 100% metilado. Para obtener dichos valores de metilación se hizo una mezcla de DNA metilado con DNA no metilado. La cantidad de DNA metilado y no metilado se muestra en la tabla 13; así como el valor de metilación correspondiente.

Tabla 13. Mezcla de DNA

| DNA metilado | DNA no metilado | Porcentaje de metilación |
|--------------|-----------------|--------------------------|
| 0 µL | 5 µL | 0 % |
| 0.5 µL | 4.5 µL | 10 % |
| 1 µL | 4 µL | 20 % |
| 1.5 µL | 3.5 µL | 30 % |
| 2 µL | 3 µL | 40 % |
| 2.5 µL | 2.5 µL | 50 % |
| 3 µL | 2 µL | 60 % |
| 3.5 µL | 1.5 µL | 70 % |
| 4 µL | 1 µL | 80 % |
| 4.5 µL | 0.5 µL | 90 % |
| 5µL | 0 µL | 100 % |

Las muestras de DNA metilado y no metilado corresponden a amplificaciones con los oligos M y U de cada gen. Con los productos de amplificación se hicieron electroforesis en gel de agarosa al 2%. Las bandas correspondientes al DNA que amplificó con el oligo M y U fueron cortadas y reservadas en tubos cónicos de 15 mL rotulados como M y U. El kit que se utilizó fue QIAquick® Gel Extraction de Qiagen, siguiendo el protocolo establecido por el proveedor (QIAquick® Spin Handbook). El DNA purificado fue cuantificado por espectrofotometría y mantenido en refrigeración a 4° C.

En las tablas 14 y 15 se muestra la cantidad de reactivos que se añadió y las condiciones de reacción para la qPCR. Cada una de las muestras se probaron por duplicado y se hizo una mix para cada una de las mezclas de DNA. La cantidad de reactivos se calculó para un volumen final de reacción de 20 µL.

Tabla 14. Reactivos para la prueba por MSP

| Reactivos | Cantidad para una reacción |
|----------------------------|----------------------------|
| Master mix Sybr Green (2X) | 10 µL |
| ROX (50X) | 0.4 µL |
| Oligo F [10µM] | 1 µL |
| Oligo R [10µM] | 1 µL |
| Mezcla de DNA | 0.5 µL |
| H ₂ O | 7.1 µL |

Tabla 15. Condiciones de reacción para la prueba por MSP

| Paso | Temperatura | Tiempo | Ciclos |
|-------------------|-------------|-------------|--------|
| Hot Start | 95° C | 10 minutos | 1 |
| Desnaturalización | 95° C | 30 segundos | 40 |
| *Alineamiento | 65° C | 45 segundos | |

* En este paso se indicó al equipo que capturara la fluorescencia.

Con los resultados que se obtuvieron de esta prueba se construyó una gráfica que permitió obtener la ecuación con la cual se calcularon los valores de metilación. Los resultados de esta prueba y las gráficas se mostrarán más adelante.

La eficiencia de la amplificación se calculó utilizando la siguiente ecuación:

$$E=10^{-1/m}$$

Donde m es la pendiente de la recta.

El porcentaje de la eficiencia se obtuvo con la siguiente ecuación:

$$\%E= (E-1) \times 100\%$$

7.2 Cuantificación de los niveles de metilación en muestras de tejido

7.2.1 Selección de pacientes

Para este estudio se utilizaron muestras de tejido adiposo subcutáneo periumbilical, provenientes de 21 pacientes obesos que fueron sometidos a cirugía bariátrica. Las muestras fueron proporcionadas por la Clínica Integral de Cirugía y Enfermedades Metabólicas del Hospital General de Tláhuac de la Secretaría de Salud de la Ciudad de México. La clínica proporcionó dos muestras de tejido las cuales se obtuvieron en diferentes tiempos, una durante la cirugía y la otra seis meses después.

7.2.1.1 Criterios de inclusión

Pacientes de entre 25 y 45 años de edad con IMC ≥ 35 kg/m² que cuenten con historia clínica completa que incluya datos antropométricos y clínicos, así como los análisis de laboratorio.

7.2.1.2 Criterios de exclusión

Obesidad causada por algún síndrome genético o disfunción endocrinológica.

7.2.1.3 Criterios de eliminación

Que no cuenten con los análisis bioquímicos, que no sea posible obtener el tejido o que no deseen participar en el estudio.

7.2.2 Extracción, cuantificación e integridad del DNA

El DNA fue extraído de aproximadamente 100 mg de tejido adiposo subcutáneo y se realizó utilizando QIAamp® DNA Mini Kit, siguiendo el protocolo establecido por el proveedor (QIAamp DNA Mini and Blood Mini Handbook). La cuantificación del DNA se realizó por espectrofotometría usando el equipo NanoDrop 1000® (ThermoFisher Sci), se utilizó como blanco 1µL de agua inyectable y 1 µL de muestra para cada cuantificación.

La integridad del DNA se verificó por electroforesis en gel de agarosa al 1% (UltraPure™ Agarose de invitrogen), el buffer que se utilizó fue TBE 1X. Se mezcló 1µL de DNA, 2 µL de buffer de carga y 3 µL de GelRed (Biotium). Las condiciones de electroforesis fueron 40 minutos, 90 Volts (fuente de poder BioRad®, No. de serie 1704401). El gel se visualizó en un fotodocumentador MultiDoc-It™ 125 Imaging System M-20V (UVP).

7.2.3 Conversión de DNA por bisulfito de sodio

Todas las muestras de DNA genómico fueron convertidas por bisulfito, utilizando el kit EZ DNA methylation- Gold™ de Zymo Research. La cantidad de DNA genómico que se convirtió fueron 500 ng. Dicho procedimiento se llevó a cabo siguiendo el protocolo establecido por el proveedor (Instruction manual EZ DNA Methylation-Gold™ Kit), las condiciones de reacción de conversión fueron las siguientes:

98° C por 10 minutos

64° C por 2.5 horas

4° C hasta por 20 horas

La reacción se llevó a cabo en el termociclador GeneAmp PCR System 9700 de Applied Biosystems. Posteriormente el DNA convertido se desulfona y se lava en columna.

7.2.4 Amplificación de DNA convertido por bisulfito por bisulfitoma

El DNA extraído de tejido adiposo está en cantidades limitadas y es una muestra muy valiosa, por lo que adicionalmente se lleva a cabo una amplificación del bisulfitoma (DNA genómico convertido por bisulfito). Para la amplificación se utilizaron 10 µL de cada muestra de DNA convertido por bisulfito. El kit que se utilizó fue EpiTect® Whole Bisulfitome de Qiagen, se siguió el protocolo establecido por el proveedor (EpiTect® Whole Bisulfitome Handbook).

Para la incubación de las muestras se utilizó el termociclador de gradiente Mastercycler® (Eppendorf).

7.2.5 Cuantificación de los niveles de metilación en tejido

Todas las muestras se cuantificaron por duplicado. La cantidad de reactivos se calculó para un volumen final de reacción de 20 µL. Las condiciones de reacción de MSP y cantidad de reactivos se muestran a continuación.

Tabla 16. Reactivos para la cuantificación en tejido por MSP

| Reactivos | Cantidad para una reacción |
|----------------------------|----------------------------|
| Master mix Sybr Green (2X) | 10 µL |
| ROX (50X) | 0.4 µL |
| Oligo F [10µM] | 1 µL |
| Oligo R [10µM] | 1 µL |
| Muestra de DNA | 0.5 µL |
| H ₂ O | 7.1 µL |

Tabla 17. Condiciones de reacción para la cuantificación en tejido por MSP

| Paso | Temperatura | Tiempo | Ciclos |
|-------------------|-------------|-------------|--------|
| Hot Start | 95° C | 10 minutos | 1 |
| Desnaturalización | 95° C | 30 segundos | 40 |
| *Alineamiento | 65° C | 45 segundos | |

* En este paso se indicó al equipo que capturara la fluorescencia.

7.2.6 Análisis estadístico

Las gráficas y valores de Ct se obtuvieron con el software del equipo QS3.

Los valores de Ct se copiaron a hojas de cálculo de Excel, en las cuales se hizo el cálculo de los niveles de metilación.

Las gráficas y las pruebas de ANOVA se hicieron con el programa R.

8. Resultados

8.1 Selección de genes

Los genes fueron seleccionados de un estudio previo en cual reportaron que después de la cirugía bariátrica diversos genes, involucrados en el metabolismo de lípidos, modifican sus niveles de metilación y que dicho cambio muestra una correlación entre los valores de metilación y los valores de lípidos de los pacientes después del tratamiento quirúrgico (Sánchez, EC. 2017). La lista de genes se muestra en la tabla 18, en ella se incluye la función y el parámetro clínico con el que se encontraron asociados en el estudio mencionado.

Tabla 18. Genes asociados a dislipidemia y su función

| Gen | Función | Correlación con parámetro clínico |
|--|--|-----------------------------------|
| NR2E1 <i>Nuclear Receptor Subfamily 2 Group E Member 1</i> | Participa en la retinogénesis como regulador de la expresión del gen PTEN, el cual actúa como supresor tumoral en diversos tejidos | TG, IMC |
| NFIX <i>Nuclear factor IX</i> | Factor de transcripción capaz de activar la transcripción y replicación | IMC, c-LDL, c-HDL |
| KCNQ1 <i>Potassium voltage-gated channel subfamily Q member 1</i> | Codifica para un canal de potasio controlado por voltaje necesario para la fase de repolarización del potencial de acción cardiaca | IMC |
| FTO <i>Alpha-ketoglutarate dependent dioxygenase</i> | Regulación de la tasa metabólica global, gasto energético y homeostasis energética. Contribuye a la regulación del tamaño corporal y acumulación de grasa en el cuerpo. En particular, participa en la regulación de la termogénesis y el control de la diferenciación de los adipocitos | IMC |

IMC: Índice de masa corporal; TG: Triglicéridos; cHDL: colesterol de baja densidad; c-LDL: colesterol de baja densidad.

8.2 Diseño de oligos

Para el diseño de oligos primero se delimitó la secuencia genética. En la siguiente tabla se indica la región genética que se utilizó como molde para el diseño de los oligos, su posición en la secuencia del gen y el sitio CpG de interés.

Tabla 19. Secuencia molde para el diseño de oligos

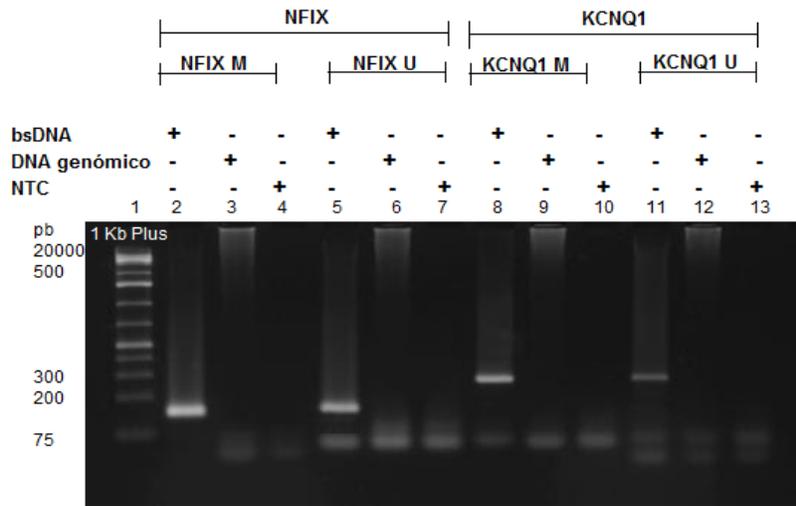
| Gen | Posición que ocupa en la secuencia del gen | Secuencia |
|--------------|--|--|
| <i>NR2E1</i> | 10075..10796 | gagcagaag gcagtgagg gcgcactgc gcgccggcc tgcgtcacc ttttattoca aaatgggtct cggcgattag aagagaacca aatacatgta gcggtgcatg aataatgctc attgtaggaa actgacactt gctcaaggaa aaaaagttag ggtataaaat cacttcatta tttgctttta ccgcagcttc ggtgctaacc ccttcagagg tcagattgct tagcatctct ctctccctct ccccttttct cctctctctc gcgccctctt tccctctcgc cccctcccc cttccccgc tttctctgga tttcaggccg cattttagat atccccgca aagtggtggy cgaccgcagc tcggggaagc actacggggt ctacgcctgc gacggctgct caggtttttt caaacggagc atccgaagga ataggaccta tgtctgaaa tctggaaacc aggtacctta gccagggctg cactgctggg ctccgctctg ctgcctctc actcttttgt ttgtgccaag gcctcctctg agttccacg cagttgagga gagaccggc cctgacctct cctctcctct cccctcctc ttgcctcaac tcttgaggc cctttggctg gggaaggcg ggaagaggta aggggaagata tgagtttaca ggagggagtc tgaagtcta gagcctcctt acactttttt aa |
| <i>NFIX</i> | 5744..6465 | ggggcagggg aggggagag ggggcgggcy cgtgccagc ggtggcccg cctctccgac cccggagctc gcagcctctg cccccacc cccaaacttt cctcggcgca aactttctgg ccccagcagc ccgggctgct gcggagtga cccggcagc ctggggaatc ccgtcccgc gcctggaggg ggggagggcg ggaggcagcc gtggacacag ccgacagtgc tgcggcca ccgtcgggtc agcctcgggc acaacagcgc gcacctggc gcgttgctag agcgcgtccc gcctgcagcg aagttccctg cgcggcgcac ggtcggcgca aaagctcga ggatgcctgt cgggcccacc aactctcctt gggctgtggc ctgagggctt aagagggcac agaagctgcc cagagtccca cagtggcctt gacagcgtt cctgcagggc caagccacag ctggtaacag tctccgaaga ggggacatct aggggctgct tagcctgct gccagccag cctgcatgtg ggggttctct agggcagggc ctaattgtcc cctctgccc gctgactct tgtcagccat gtgccaagt tgcacacgc ttacagtggc agtccacatg ggtatggctc ctactttgtc tgggtcctac cgggagtgtg cagtgggtgc aagggcgag gggtttctg ggggtgtgt ca |
| <i>KCNQ1</i> | 3265..3986 | tgtccagttg tccaaacgct gcttattcaa agctcacctt cctcctgctg agtggggag ggaaggcaga gactccatgc aggtgtatgt atgttcacc ggaagtaac tgcgtaatgc gtgctgtgtg cctcgcagag ctgactgact gccccatct tctgaccgc tgcctctctg caccttcaact gatatgcttc ccagggaagt accctctcct cggcctccct tgtgttata cagcgcccag cacaagctgg gaccactcc atccactctt gctgcaata cagactgtgc actcctgtgt ggaacctcag taggtgggg agtcaggcgt caaggccctg ggtggactc cgtccacgat aaaagagcag acttttgca gggggtgta gatacatcaa atlgaccocag gggtctcagg gacgacctg aagtgtcaca tgagttatg gctcctcggc gggggggaga gtcaccgctg agctccacct ttagtccctg cctcagggct ggtgtagta tctgaaaaa agccggtctc ttctgttggc tgccccccac cccccccca agcctgagac gctctgagac ccaaatgcca gtacggggcg ggaggcagtg cagagacctg tgaatatctt ccgatgtgac caaccacc ccaccaggg gaatccacgg ggcgcagcgg cagcgcggtc tcgacgggtg gg |
| <i>FTO</i> | 56251..56972 | agccaaatgt catttatgtg agatttgcct cttggatgtg aaaggcctct ctttcttaat gatgggagc gattgggctg cagggctgga gagcttgac ggttgacatg acccagagga gatgctccag gctgtggga gtcagaggcc taggactctc cctcctgagg gagaaagac atgaggatat tcagctgtct gatccctcc attgaggtgt acttgaggga ttacagggag tacttcaaac actcgttgt caagtccata tattcgggtg gctctcagtt ttggagcact tggagtttc ttattttgaa gaccatttgt ttgaatgaaa tcatcaatca tttctagttt cgtaaaactt ggaagtctcc ttgtggtaga gactgcacag atccctctt gctctttga gtcatggact tttcaggctg gactgctgccc caaaatgcag attgcatttc cccagcctcc cctgcaacgg ggtgtggcca tgtgactgag agaaggtgta ctatgggagt cctgaggtg tttctttaag agaaagctgg tgtatgccc ttgccccttg cttcttaggc ccttctctct gtcccgtgc ctggaatgta catgctggac ttggatcttg aaggtgaagc ccaagcctta tgggctaaaa ggggcccggc ctctgagaac ttcaggagaa cactgtccc agcctggtta ag |

Las citosinas y guaninas marcadas en azul corresponden al sitio CpG de interés.

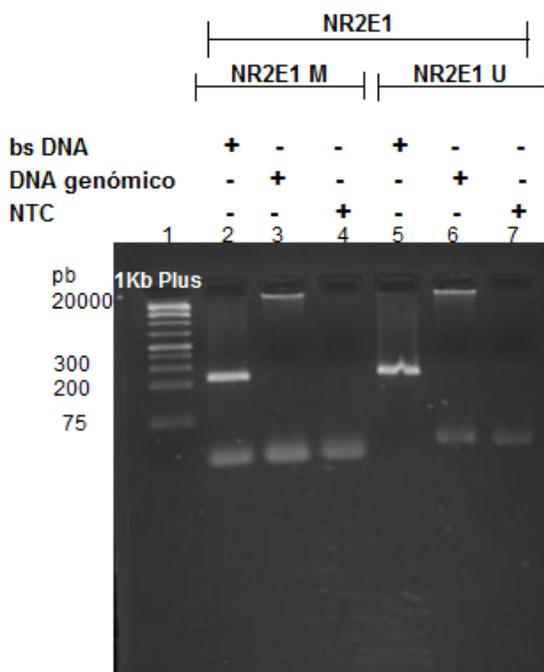
8.3 Estandarización de condiciones

El primer paso en la estandarización fue evaluar la especificidad de los productos de PCR, mediante electroforesis en geles de agarosa. Los resultados mostraron un solo producto de amplificación con el tamaño deseado, el cual sólo amplificó con DNA convertido con bisulfito y no con DNA genómico. Los resultados se muestran en la figura 5. Las imágenes que se muestran corresponden a una electroforesis en gel de agarosa al 2% de los productos de reacción de PCR en punto final de los genes *NR2E1*, *FTO*, *NFIX* y *KCNQ1*. El tamaño de los productos de amplificación de *NFIX* es de 150 pb y el de *KCNQ1* es de 281pb. De acuerdo con el marcador de peso molecular se puede observar que los tamaños de los productos de amplificación corresponden con el tamaño esperado. Las bandas que se aprecian justo debajo de los pozos 3, 6, 9 y 12 corresponden al DNA genómico. En los pozos 4, 7, 10, 13 no se aprecia ninguna banda como se esperaba, ya que esta reacción no contenía DNA. Las bandas que aparecen debajo de los productos de amplificación corresponden a los oligos. El tamaño esperado del producto de amplificación de *NR2E1*, es de 211 pb, al comparar los resultados con el marcador de peso molecular se observa que el tamaño corresponde al esperado. La banda que se aprecia debajo de los pozos 3 y 6 corresponde al DNA genómico. Las bandas que están abajo corresponden a los oligos. El tamaño esperado del producto de amplificación de *FTO*, era de 266 pb, al comparar las bandas con el marcador de peso molecular se observó que el tamaño de los productos de amplificación correspondió al esperado. Como se esperaba, los oligos no amplificaron con el DNA genómico, el cual se encuentra debajo de los pozos 4 y 9 y tampoco hubo amplificación en los controles (pozos 5 y 8).

(a)



(b)



(c)

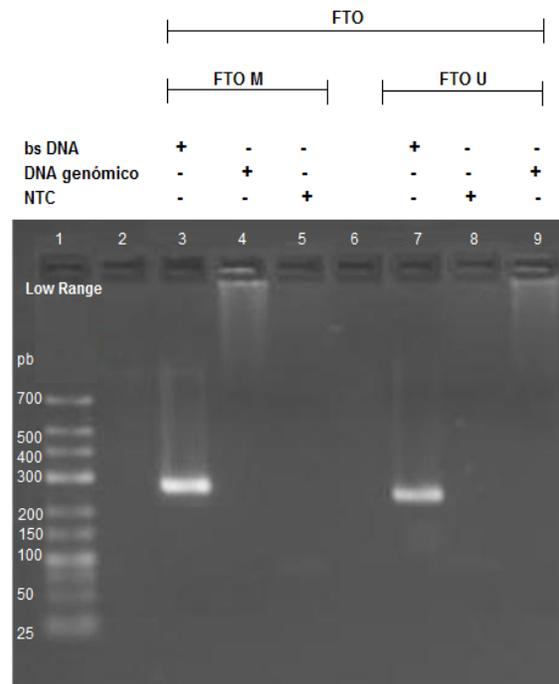


Figura 5. Productos de amplificación de NR2E1, FTO, NFIX y KCNQ1 con DNA convertido por bisulfito. El abreviado bsDNA quiere decir DNA convertido por bisulfito y NTC, sin templado. En (a) se muestran los resultados de NFIX y KCNQ1, las bandas que se aprecian en los pozos 2, 5, 8 y 11 corresponden a la amplificación con el DNA convertido con bisulfito. En los pozos 2 y 8, está la amplificación con el oligo M, y en los pozos 5 y 11 está la amplificación con el oligo U. En (b) se muestran los resultados del gen NR2E1, en el gel se aprecia la amplificación del DNA convertido por bisulfito (pozo 2 oligo M y pozo 5 oligo U). En (c) se muestran los resultados del gen FTO, en el pozo 3 está la amplificación del DNA convertido por bisulfito con el oligo M y en el pozo 7 con el oligo U.

Los resultados que se obtuvieron por PCR en punto final se probaron por qPCR en tiempo real. Las condiciones de reacción se mantuvieron sin cambios, sólo se modificó la cantidad de muestra, como se señaló en la tabla 11.

8.4 Prueba de la cuantificación de la metilación

Para la cuantificación se construyó una tabla con valores teóricos de metilación y Ct teórico correspondiente (del inglés *Cycle threshold*) la cual se muestra a continuación.

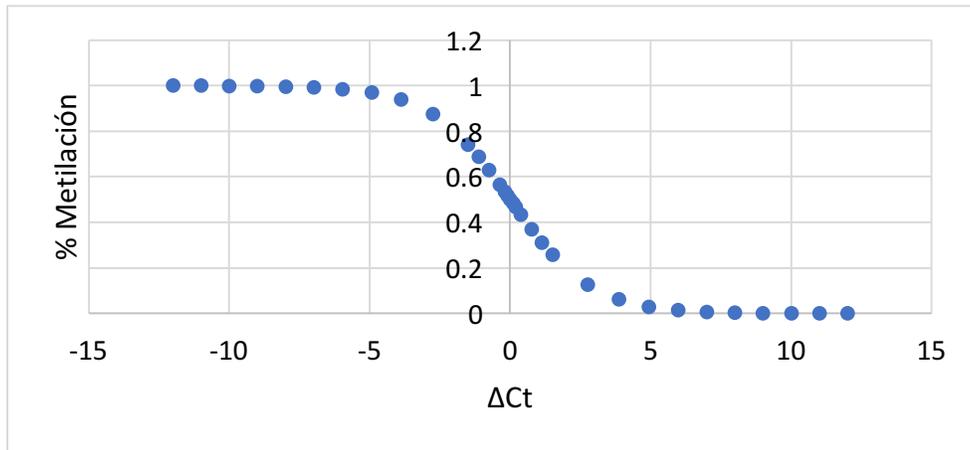
Tabla 21. Valores teóricos de metilación y Ct

| Valor de metilación | Ct oligo M | Ct oligo U | Δ Ct |
|---------------------|-------------|-------------|------------|
| 0.000244141 | 36 | 24.00048828 | 11.9995117 |
| 0.000488281 | 35 | 24.00097656 | 10.9990234 |
| 0.000976563 | 34 | 24.00195313 | 9.99804688 |
| 0.001953125 | 33 | 24.00390625 | 8.99609375 |
| 0.00390625 | 32 | 24.0078125 | 7.9921875 |
| 0.0078125 | 31 | 24.015625 | 6.984375 |
| 0.015625 | 30 | 24.03125 | 5.96875 |
| 0.03125 | 29 | 24.0625 | 4.9375 |
| 0.0625 | 28 | 24.125 | 3.875 |
| 0.125 | 27 | 24.25 | 2.75 |
| 0.25 | 26 | 24.5 | 1.5 |
| 0.3125 | 25.75 | 24.625 | 1.125 |
| 0.375 | 25.5 | 24.75 | 0.75 |
| 0.4375 | 25.25 | 24.875 | 0.375 |
| 0.46875 | 25.125 | 24.9375 | 0.1875 |
| 0.484375 | 25.0625 | 24.96875 | 0.09375 |
| 0.5 | 25 | 25 | 0 |
| 0.515625 | 24.96875 | 25.0625 | -0.09375 |
| 0.53125 | 24.9375 | 25.125 | -0.1875 |
| 0.5625 | 24.875 | 25.25 | -0.375 |
| 0.625 | 24.75 | 25.5 | -0.75 |
| 0.6875 | 24.625 | 25.75 | -1.125 |
| 0.75 | 24.5 | 26 | -1.5 |
| 0.875 | 24.25 | 27 | -2.75 |
| 0.9375 | 24.125 | 28 | -3.875 |
| 0.96875 | 24.0625 | 29 | -4.9375 |
| 0.984375 | 24.03125 | 30 | -5.96875 |
| 0.9921875 | 24.015625 | 31 | -6.984375 |
| 0.99609375 | 24.0078125 | 32 | -7.9921875 |
| 0.998046875 | 24.00390625 | 33 | -8.9960938 |
| 0.999023438 | 24.00195313 | 34 | -9.9980469 |
| 0.999511719 | 24.00097656 | 35 | -10.999023 |
| 0.999755859 | 24.00048828 | 36 | -11.999512 |

DNA M: DNA metilado; DNA No M: DNA no metilado; Ct oligo M: valor de Ct del DNA amplificado con el oligo M; Ct oligo U: valor de Ct del DNA amplificado con el oligo U; delta Ct: diferencia entre el valor de Ct de M y U.

La diferencia de los valores de Ct de los oligos M y U, corresponde a la delta Ct. Con los valores de delta Ct y de metilación de la tabla anterior se construyó una gráfica, la cual se muestra en la figura 6. Puede observarse que la gráfica presenta un comportamiento sigmoideal.

(a)



(b)

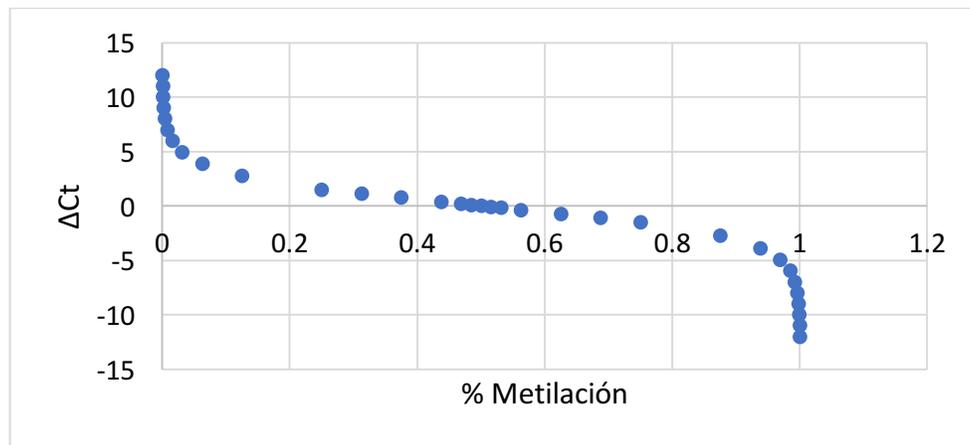


Figura 6. Correlación de los valores teóricos de ΔC_t con los de metilación. La gráfica (a) se obtiene al relacionar los valores de C_t con los valores de metilación. En la gráfica (b), se invierte la relación para observar el efecto de los valores de metilación sobre el valor de C_t , el cual disminuye conforme el valor de metilación aumenta.

La ecuación que describe la gráfica (a) en la figura 6 es:

$$\frac{1}{1 + e^{-x}}$$

De acuerdo a la ecuación anterior se planteó la siguiente fórmula para calcular el valor de metilación por la técnica MSP:

$$\frac{1}{1 + 2^{\Delta C_t}}$$

Donde

ΔC_t : C_t oligo M - C_t oligo U

Para poner a prueba el planteamiento teórico, se realizó la amplificación de cada gen utilizando un DNA de cantidades conocidas de metilación. En la siguiente figura se muestran las gráficas de amplificación del gen NR2E1.

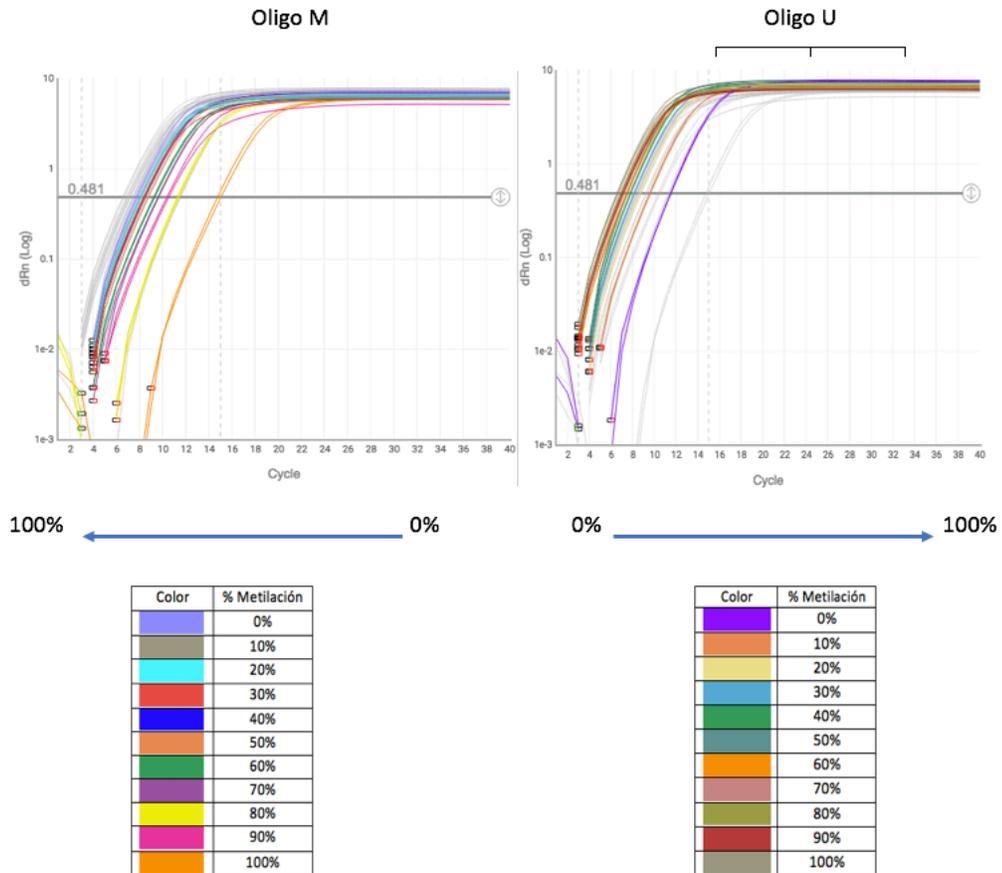


Figura 7. Gráfica de amplificación del gen NR2E1. En ambas gráficas se observa que la amplificación inicia en los primeros ciclos. Las flechas indican el orden de amplificación de acuerdo a los valores de metilación descritos en el código de colores que se muestra debajo de cada gráfica.

Para evaluar la eficiencia de la reacción se graficó el logaritmo del porcentaje de metilación contra el valor de Ct. En la figura 8 se muestran los resultados de la amplificación con el oligo M y U de cada gen.

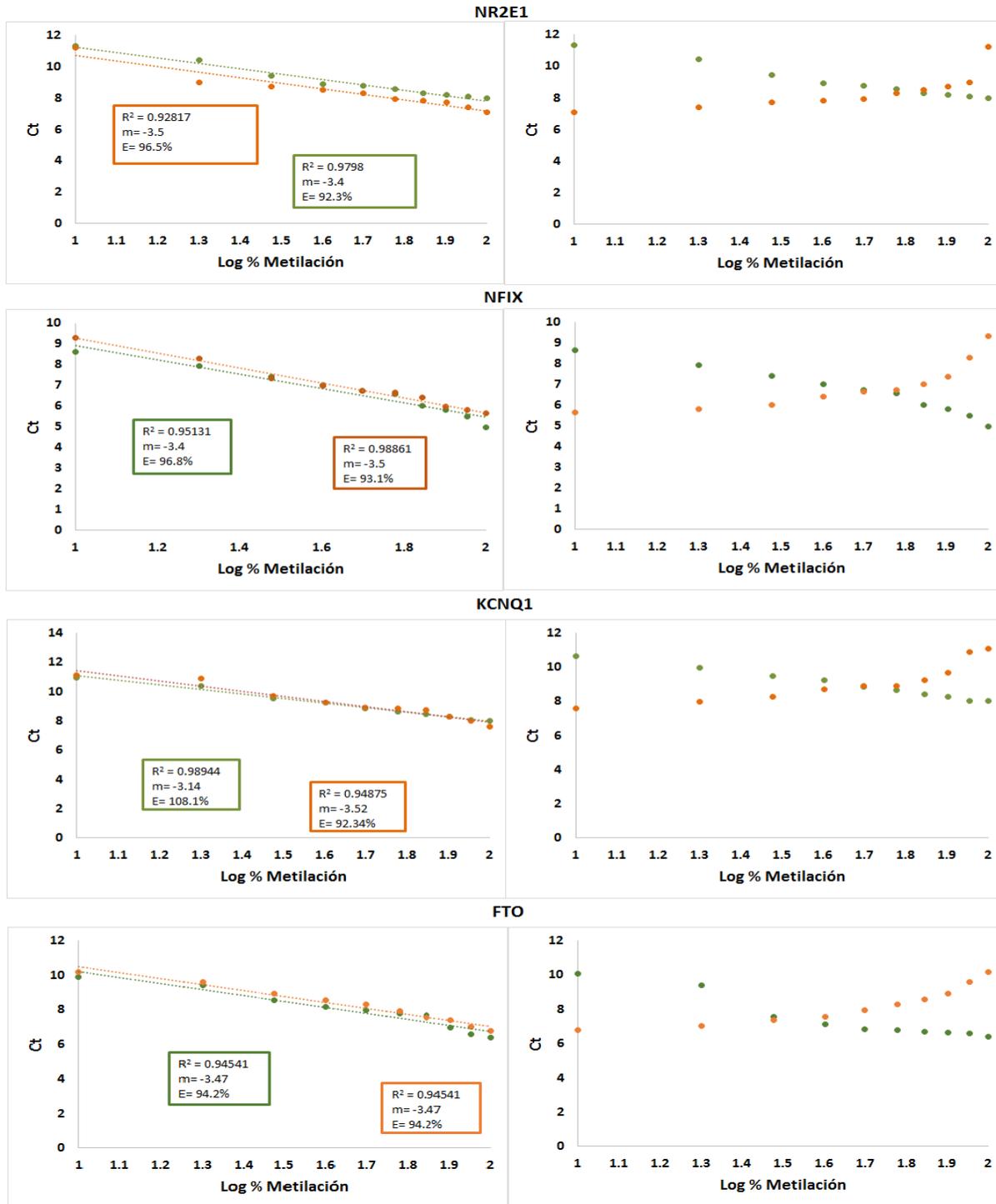


Figura 8. Evaluación de la eficiencia de amplificación. Las cuatro gráficas que se muestran del lado izquierdo muestran el valor de la pendiente y de la eficiencia para la amplificación con el oligo M (líneas de color verde) y con el oligo U (líneas de color naranja). Los valores de la eficiencia para cada amplificación mostraron estar dentro del rango del 90-110%. Las gráficas del lado derecho muestran la misma relación que las del lado izquierdo, sólo que estas se construyeron para poder determinar la similitud entre las eficiencias. E se refiere al porcentaje de la eficiencia de la PCR y m al valor de la pendiente.

Con los valores de Ct de la amplificación con los oligos M y U de cada muestra se calculó el ΔCt . Los valores de ΔCt se sustituyeron en la ecuación (de función sigmoide) que se planteó para obtener el valor de metilación calculado. En la figura 9 se muestran las gráficas de correlación, de los valores de metilación con los de ΔCt .

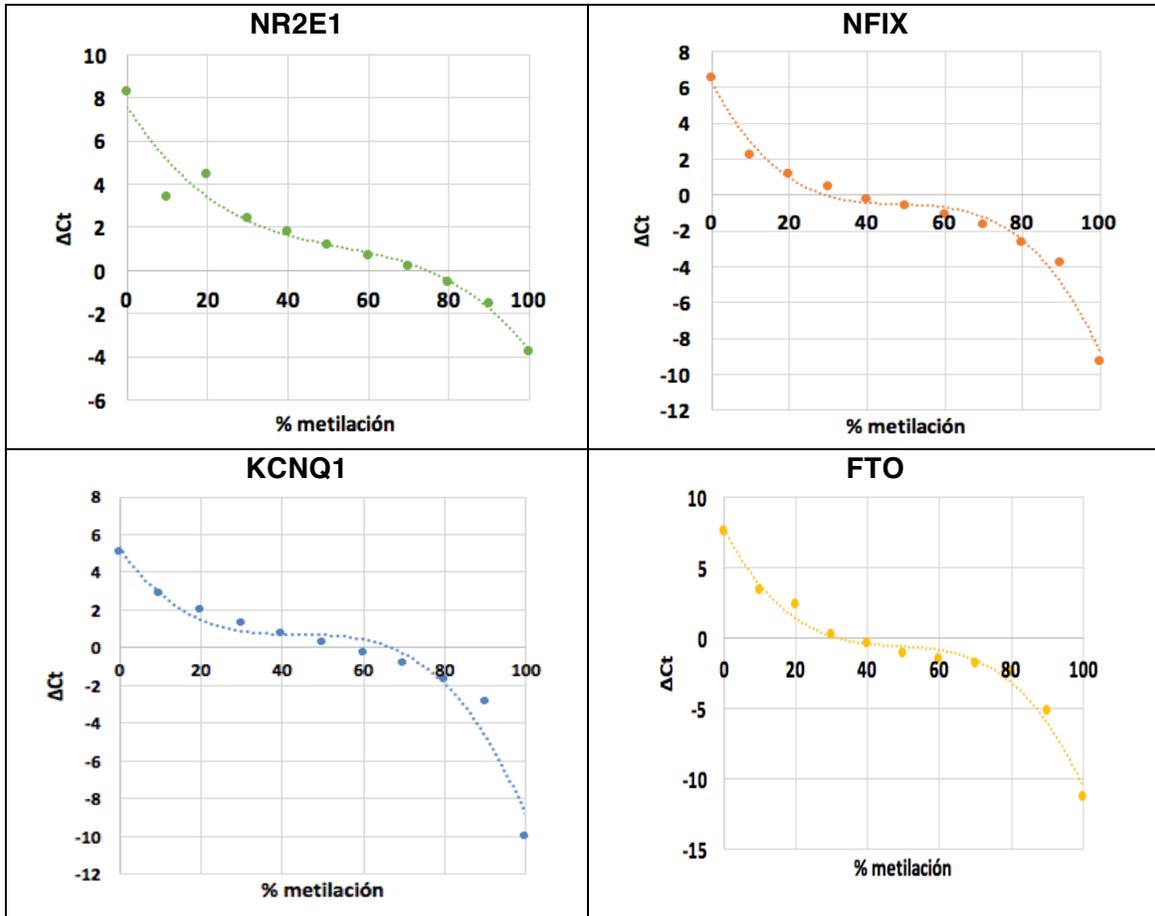


Figura 9. Correlación de los valores de metilación calculados con los de ΔCt . En las cuatro gráficas se muestra que la tendencia de la curva es similar a la de la curva teórica que se muestra en la figura 5 (b).

Posteriormente, se calculó la correlación entre los valores de metilación calculados con los valores de metilación reales (0% a 100%). Se calculó el coeficiente de correlación para cada gen. Los resultados se muestran en la figura 10.

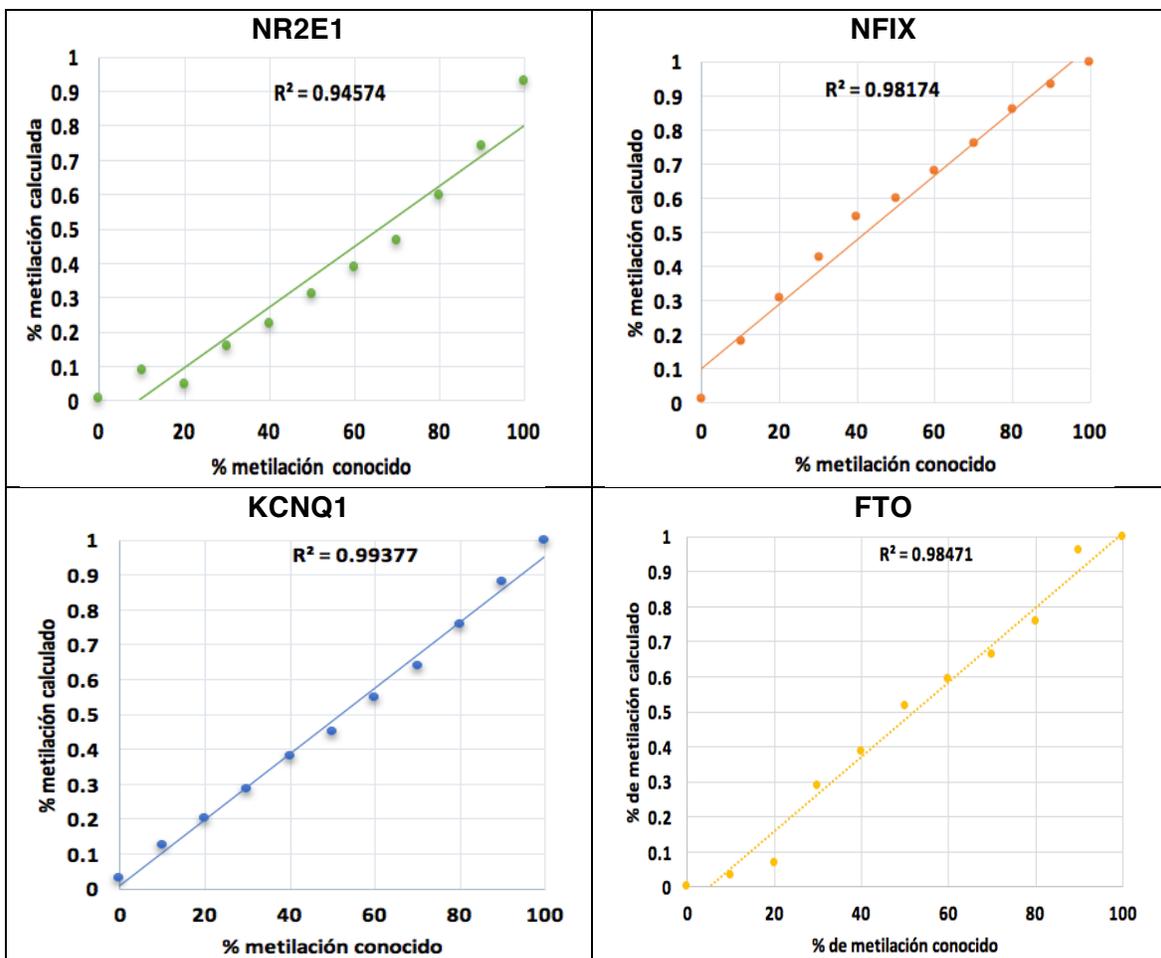


Figura 10. Correlación de los valores de metilación reales con los valores de metilación calculados. De acuerdo a los valores de R^2 se puede apreciar que hay una buena correlación entre ambas variables, para los cuatro genes, lo que demuestra que los valores de metilación calculados son muy parecidos a los valores de metilación conocidos.

8.5 Selección de pacientes

En la siguiente tabla se muestran el promedio de los valores de los parámetros clínicos y bioquímicos de los 21 pacientes antes (T0) y 6 meses después de la cirugía (T6).

Tabla 22. Parámetros clínicos y bioquímicos de los pacientes

| | | Parámetros | T0 | T6 |
|--------------------|-------|--------------------------|--------|--------|
| | | Total | | |
| | | IMC (Kg/m ²) | 44.23 | 29.5 |
| Pacientes (n) | | CT (mg/dL) | 171.6 | 154.45 |
| | | TG (mg/dL) | 132.31 | 96.6 |
| Masculino/Femenino | 2/19 | c-HDL (mg/dL) | 43.23 | 51.62 |
| Edad media | 39.96 | c-LDL (mg/dL) | 111.9 | 89.5 |

IMC: Índice de masa corporal; CT: Colesterol Total; TG: Triglicéridos; cHDL: colesterol de baja densidad; c-LDL: colesterol de baja densidad; T0: antes de la cirugía; T6: seis meses después de la cirugía.

8.6 Extracción, cuantificación e integridad del DNA

Con la muestra de tejido adiposo visceral, se realizó la extracción de DNA, se llevó a cabo la cuantificación y analizó la integridad mediante electroforesis en gel de agarosa. De todas las muestras se obtuvo DNA en cantidad y calidad suficiente para llevar a cabo el análisis de metilación por MSP. Las concentraciones de DNA fluctuaron entre 110.03 ng/ μ L y 452.09 ng/ μ L. La integridad del DNA extraído se evaluó mediante electroforesis en gel de agarosa de todas las muestras. En la figura 11 se muestra uno de los geles que se hicieron para evaluar la integridad del DNA de las muestras de dos pacientes.

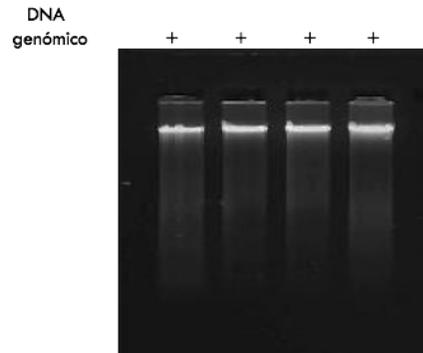


Figura 11. Evaluación de la integridad del DNA genómico mediante electroforesis en gel de agarosa al 2%. Se muestra la integridad del DNA genómico extraído de tejido adiposo subcutáneo de dos pacientes, dos corresponden a la muestra que toman antes de la cirugía (pozos 1 y 3) y las otras dos a la muestra que toman seis meses después de la intervención (pozos 2 y 4).

8.7 Conversión por bisulfito de sodio y amplificación

La cantidad que se obtiene de DNA convertido por bisulfito de sodio es de aproximadamente 12 μ L, de los cuales 10 μ L se utilizan para la amplificación del DNA convertido (bisulfitoma). Una vez amplificado, las muestras de los pacientes fueron empleadas para la cuantificación de la metilación por MSP.

En la imagen de la figura 12 se muestra el gel de electroforesis de una muestra de DNA convertido y posteriormente amplificado (bisulfitoma).

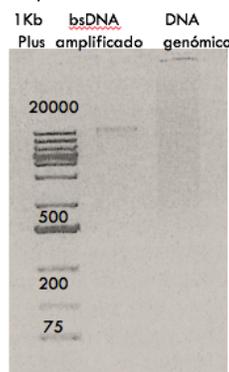


Figura 12. Evaluación de la amplificación del DNA convertido por bisulfito de sodio (bisulfitoma) mediante electroforesis en gel de agarosa al 2%. En el pozo 1 está el marcador de peso molecular, en el pozo 2 está la muestra amplificada de DNA convertido por bisulfito (bsDNA amplificado) y en el pozo 3 se encuentra la muestra DNA genómico que se utilizó para la conversión y posterior amplificación.

8.8 Cuantificación de los niveles de metilación en tejido adiposo

Posteriormente se realizó la cuantificación de la metilación por MSP de cada gen en cada muestra de los pacientes. Con los resultados de la cuantificación se analizaron los cambios que pudieran presentarse después de la cirugía bariátrica.

Para observar si hubo cambios en los valores de metilación entre el grupo de individuos pre quirúrgicos (OB) y post quirúrgicos (PQX) se construyeron gráficas de caja y bigotes.

Para saber si hubo diferencias significativas en los valores de metilación entre los grupos OB y PQX se hizo la prueba de ANOVA, los resultados de la prueba se muestran en la debajo de las gráficas.

En el caso del gen *NR2E1*, el intervalo de los valores de metilación de los individuos OB va de 0.2 a 0.83, mientras que el de los PQX va de 0.25 a 0.52. Cada punto representa el valor de metilación de cada paciente (n=21). El punto que está fuera de la caja en el grupo PQX corresponde a un valor atípico. De acuerdo con el valor de p, no hay diferencia significativa entre los grupos, aunque claramente se observa un cambio en el conjunto de los datos.

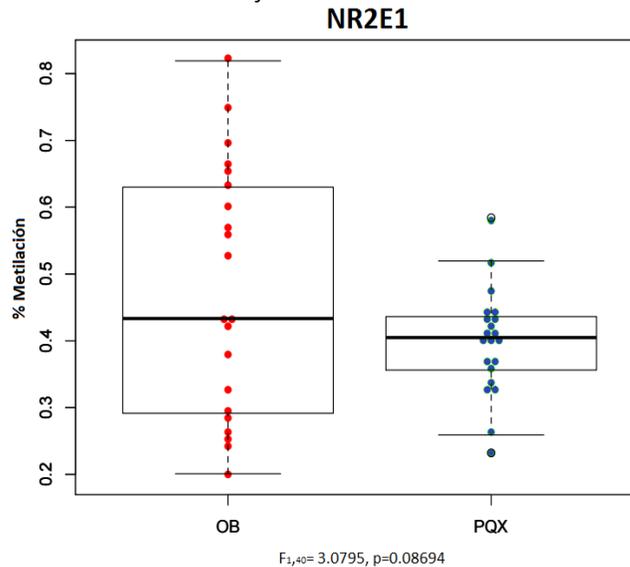


Figura 13. Comparación de los niveles de metilación en el gen *NR2E1* entre individuos OB y PQX. La abreviación OB se refiere al grupo de pacientes pre quirúrgicos y la abreviación PQX se refiere al grupo de pacientes postquirúrgicos. La barra negra que divide cada caja indica la media.

Para el caso del gen *NFIX*, el rango de los valores de metilación de los individuos OB va de 0.23 a 0.81, mientras que el de los PQX va de 0.22 a 0.78. Cada punto representa el valor de metilación de cada paciente (n=21). La barra negra que divide la caja indica la media. De acuerdo con el valor de p, no hay diferencia significativa entre los grupos, aunque la media cambia y puede verse una tendencia en el comportamiento de los datos.

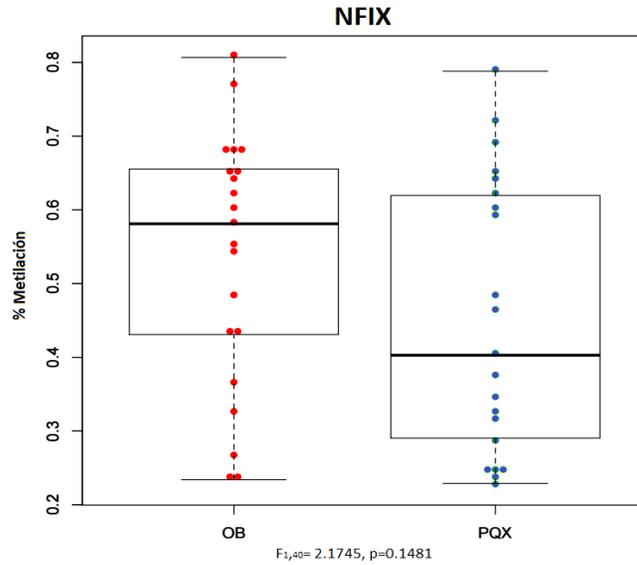


Figura 14. Comparación del porcentaje de metilación del gen *NFIX* entre individuos OB y PQX. La abreviación OB se refiere al grupo de pacientes pre quirúrgicos y la abreviación PQX se refiere al grupo de pacientes postquirúrgicos. La barra negra que divide cada caja indica la media.

En el gen *KCNQ1* el rango de los valores de metilación de los individuos OB va de 0.39 a 0.88, mientras que el de los PQX va de 0.22 a 0.67. Cada punto representa el valor de metilación de cada paciente (n=21). La barra negra que divide la caja indica la media. En este gen se muestra un mayor cambio después de la cirugía bariátrica, aunque de acuerdo con el valor de p, no hay diferencias significativas entre los grupos.

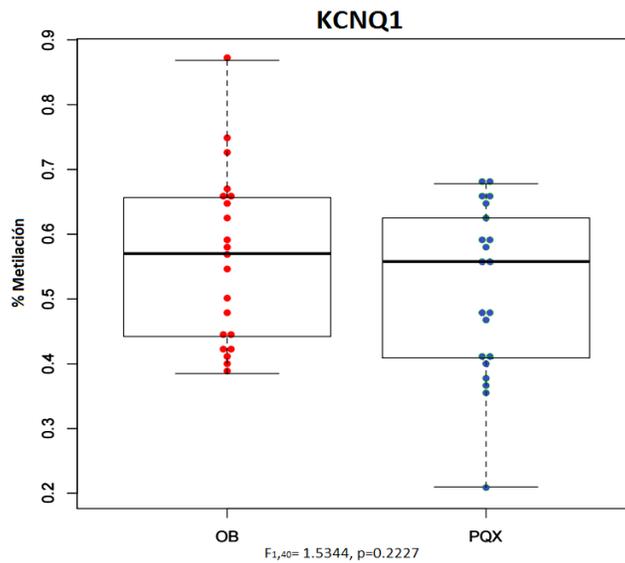


Figura 15. Comparación del porcentaje de metilación del gen *KCNQ1* entre individuos OB y PQX. La abreviación OB se refiere al grupo de pacientes pre quirúrgicos y la abreviación PQX se refiere al grupo de pacientes postquirúrgicos. La barra negra que divide cada caja indica la media.

Por último, para el gen *FTO* el rango de los valores de metilación de los individuos OB va de 0.39 a 0.88, mientras que el de los PQX va de 0.25 a 0.70. Cada punto representa el valor de metilación de cada paciente (n=21). La barra negra que divide la caja indica la media. En este gen también se observa un cambio después de la cirugía, aunque el valor de P muestra que no hay diferencias significativas entre los grupos.

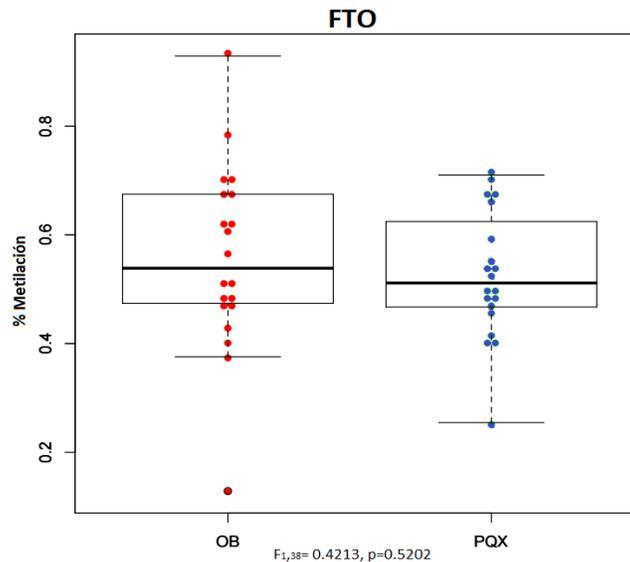


Figura 16. Comparación del porcentaje de metilación del gen *FTO* entre individuos OB y PQX. La abreviación OB se refiere al grupo de pacientes pre quirúrgicos y la abreviación PQX se refiere al grupo de pacientes postquirúrgicos. La barra negra que divide cada caja indica la media.

9. Discusión

Los métodos estándar para el análisis de metilación de todo el genoma (WGSBS) y región específica (BSP), proporcionan un perfil de metilación a una resolución de un par de base, lo que los hace los métodos más completos. Sin embargo, su costo los hace poco factibles para el análisis de varias muestras. Por esta razón, es importante desarrollar técnicas que permitan analizar la metilación en un mayor número de muestras, a un costo más accesible.

En este estudio se describe el desarrollo y los resultados obtenidos del análisis de metilación de cuatro genes, por la técnica MSP, la cual se basa en la amplificación por qPCR de una región en particular que contiene al sitio CpG de interés. Para la amplificación utiliza dos pares de oligos diferentes, que son específicos para la secuencia metilada o no metilada. La diferencia de los valores de Ct de la amplificación con la secuencia metilada y la no metilada permiten obtener el valor de metilación.

Se evaluaron los estados de metilación de sitios CpG de los genes *NR2E1*, *NFIX*, *KCNQ1* y *FTO*.

Los resultados obtenidos en la estandarización mostraron que la técnica funciona y permite obtener valores de metilación cercanos a los reales, al mostrar una buena correlación entre los valores de metilación calculados y los conocidos.

En la determinación de los niveles de metilación en tejido adiposo, se observó que los cambios en la metilación entre los grupos de pacientes OB y PQX, para los cuatro genes, no son

estadísticamente significativos, lo que podría deberse al tamaño de muestra o a la sensibilidad de la técnica para detectar cambios pequeños en la metilación, lo cual habría que analizarse detalladamente en estudios posteriores.

9.1 Métodos para el análisis de la metilación de una región específica: ventajas y desventajas

Varios métodos se han desarrollado para analizar el estado de metilación de regiones particulares del DNA. En los primeros estudios sobre metilación utilizaban enzimas de restricción sensibles a metilación y los fragmentos eran analizados por Southern blot. En la actualidad, este enfoque sigue vigente; sin embargo, su uso requiere de grandes cantidades de DNA y la información que proporcionan sobre la metilación se limita a los sitios de reconocimiento de las enzimas (Galm O. y Herman J.G., 2005).

La mayoría de las técnicas recientes utilizan como principio el tratamiento con bisulfito de sodio de DNA genómico para distinguir entre citosinas metiladas y no metiladas. Esta modificación química, que convierte todas las citosinas no metiladas en uracilos, se ha convertido en la base para una variedad de técnicas. La subsiguiente amplificación por PCR del DNA convertido sustituye los residuos de uracilo por timinas y las 5-metil citosinas por citosinas. Varios métodos se basan en la amplificación por cebadores que hibridan en sitios que carecen de dinucleótidos CpG en la secuencia genómica original (Galm O. y Herman J.G., 2005). De este modo, los cebadores amplifican de forma independiente al estado de metilación, lo que da como resultado una mezcla de diferentes productos de PCR, que tienen la misma longitud, pero son diferentes en su secuencia debido a sitios de potencial metilación en los dinucleótidos CpG. Estos productos de PCR se pueden analizar mediante diferentes métodos, como COBRA, Ms-SNuPE o ERMA. Todas estas técnicas proporcionan información cuantitativa detallada sobre los patrones de metilación de una región de DNA particular y se utilizan ampliamente en la investigación básica. Sin embargo, estos métodos resultan ser costosos, su desarrollo requiere de mucho tiempo e implica el uso de materiales radiactivos o enzimas de restricción.

Al igual que la técnica MSP, existen otros métodos que utilizan como principio la conversión por bisulfito del DNA y la posterior amplificación por PCR. Siendo los más utilizados BSP y pirosecuenciación.

La técnica BSP se considera como una tecnología “gold standard”, porque proporciona un acercamiento cualitativo, cuantitativo y eficiente para identificar a la 5-metil citosina en la resolución de un par de base (Li Y. y Tollefsbol T.O., 2011).

La técnica se basa en la secuenciación de la amplificación por PCR de una región en particular. Como principio de la técnica está el tratamiento del DNA con bisulfito de sodio y la subsecuente amplificación por PCR y secuenciación.

Al igual que la técnica MSP, el diseño de los oligonucleótidos representa el paso más importante en el desarrollo de la técnica. La principal característica que deben cumplir los oligos es que no deben contener ningún sitio CpG en su secuencia para evitar la discriminación entre sitios metilados y no metilados.

En este trabajo se diseñaron oligonucleótidos que presentaron una buena especificidad y eficiencia de amplificación, que muchas veces representan el principal reto en la cuantificación de la metilación con DNA convertido por bisulfito, por lo que podría utilizarse en otras técnicas basadas en PCR como COBRA o modificarse y también emplearse para secuenciación.

Una de las mayores ventajas que ofrece la técnica de pirosecuenciación es la posibilidad de realizar varias lecturas en una sola corrida, por lo que se pueden identificar secuencias de diferentes muestras en la misma ejecución, lo que aumenta la eficiencia y el rendimiento, y reduce los costos, lo que la hace ideal en el análisis a gran escala (Siqueira J.F., Fouad A.F. y Rôças I.N., 2012). Sin embargo, la principal desventaja de utilizar la pirosecuenciación es que para su desarrollo se requiere de equipo especializado mientras que el equipo necesario para el desarrollo de MSP es de fácil acceso para cualquier laboratorio. Por lo tanto, la técnica MSP sigue siendo la más adecuada para el análisis de metilación a gran escala. Además, al igual que MSP, el éxito de las técnicas BSP y pirosecuenciación también depende de un buen diseño de oligonucleótidos, por lo que en su desarrollo no muestran una ventaja sobre MSP.

Entre las desventajas de MSP a comparación de las técnicas BSP y pirosecuenciación es que el análisis de la metilación se limita a un sitio CpG, mientras que por las otras dos técnicas se pueden evaluar más sitios, lo que permite obtener un valor de metilación global de la región de interés (Siqueira J.F., Fouad A.F. y Rôças I.N., 2012).

Una de las desventajas de MSP que se observaron en nuestro estudio es que la técnica requiere de una mayor concentración de DNA convertido, por lo que fue necesario elevar la concentración de las muestras. El método que se utilizó se basa en la tecnología de amplificación por desplazamiento múltiple (MDA), el cual consiste en el uso de una DNA polimerasa de procesamiento único, es decir, que la enzima es capaz de replicar el DNA sin disociarse de la plantilla. Además, la enzima tiene actividad de corrección de exonucleasa 3'-5', lo que ayuda a mantener la fidelidad de la secuencia diana durante la replicación.

La amplificación se realizó porque después de la conversión con bisulfito de sodio, el DNA se fragmenta, siendo el cambio en la composición de nucleótidos y la fragmentación los que afectan la amplificación del DNA, cuando se usan métodos convencionales para su análisis, como es la PCR. El método de amplificación se recomienda cuando el nivel de fragmentación del DNA es elevado. Otro factor que influye en la integridad del DNA convertido es la temperatura de almacenamiento. A temperaturas inadecuadas el DNA tiende a degradarse. La temperatura recomendada de almacenamiento es de -70° C, para periodos prolongados y para periodos cortos es de -20° C.

Una alternativa a la amplificación es el aumento en la concentración de DNA genómico que se va a convertir por bisulfito. Sin embargo, esto no es recomendable, ya que se corre el riesgo de que se lleve a cabo una conversión incompleta.

La principal desventaja de la técnica MSP es que no permite detectar cambios pequeños en la metilación. En la literatura reportan que se pueden detectar cambios de hasta el 0.1 % (Galm O. y Herman J.G., 2005). En la gran mayoría de los estudios en los que utilizan MSP como método de análisis, evalúan cambios en la metilación en genes involucrados en cáncer, en donde los cambios que observan son muy grandes. En la mayoría de los casos los cambios más pequeños son del 5 %, mientras que los más grandes van del 25 al 35 % (Sturgeon S.R., et al., 2012).

Los cambios que reportaron en el estudio de Sánchez E.C., van del 0.05 al 0.1 % (Sánchez E.C., 2017), por lo que nuestro análisis se realizó en el límite de detección de la técnica. Por lo tanto, la dispersión de los datos, como se aprecia en las figuras 13, 14, 15 y 16, se debe a la reducción en la sensibilidad de la técnica para detectar los cambios pequeños en la metilación, por lo que en los valores menores al 0.1 % son los que producen la dispersión en los datos.

Los rangos de metilación son muy parecidos, siendo la dispersión de los datos lo que impide observar la diferencia entre los grupos.

Aunque los valores de metilación entre los grupos de pacientes OB y PQX no muestran diferencias significativas, como se esperaba, la técnica permitió obtener un rango de metilación parecido al observado en el estudio de referencia.

A pesar de las limitaciones de la técnica MSP, ésta mostró tener una buena linealidad, la eficiencia adecuada y la especificidad en la amplificación con DNA convertido y no con DNA genómico, lo que descarta una amplificación inespecífica por una conversión ineficiente.

9.2 Especificidad y eficiencia de MSP

Para poder determinar los niveles de metilación se utilizaron los valores de Ct, los cuales corresponden al número del ciclo al cual la señal fluorescente refleja un aumento estadísticamente significativo sobre la señal de referencia calculada, es decir, el número de ciclo al cual la señal fluorescente cruza la línea umbral (threshold). El Ct se utiliza porque su valor está inversamente relacionado con la cantidad de templado inicial. Dada la importancia del Ct se debe evaluar el rendimiento de la reacción, midiendo factores que influyen en su valor, como son la especificidad analítica y la eficiencia de reacción.

La especificidad analítica se refiere al reconocimiento de la región de interés y no de otras. En nuestro estudio los oligonucleótidos no sólo fueron capaces de reconocer el sitio de interés, sino que también amplificaron de forma específica con DNA convertido y no con DNA genómico. Esto se debe a su diseño, en el cual se toma en cuenta la modificación que sufre el DNA después del tratamiento con bisulfito, es por esto que el diseño de oligos para MSP no debe realizarse con los programas convencionales.

La eficiencia es uno de los indicadores más importantes del rendimiento de la reacción, ya que este parámetro permite determinar si los resultados obtenidos son precisos y reproducibles (Svec D., et al., 2015). Para determinar su valor, se hizo una correlación entre los valores de metilación y los de Ct. De esta correlación se calculó la pendiente y el valor de R^2 . A partir del valor de la pendiente se calculó el valor de la eficiencia. Idealmente, la eficiencia de la PCR debe ser del 100 %, lo que significa que la cantidad de producto se duplica después de cada ciclo. El porcentaje aceptable de eficiencia va del 90 % al 110 %. Los factores experimentales que pueden influir en la eficiencia son la longitud, estructuras secundarias y contenido GC del amplicón. Las concentraciones inadecuadas de reactivos y la calidad de la enzima pueden dar lugar a eficiencias por debajo del 90 %. Mientras que la presencia de inhibidores en uno o más de los reactivos puede producir eficiencias de más del 110 %. En este trabajo se observaron que las eficiencias fueron adecuadas para la amplificación con los oligos M y U de los cuatro genes, por lo que se descarta que la modificación del DNA por la conversión con bisulfito intervenga en la eficiencia de la reacción o cualquier otro factor inherente a la reacción de PCR.

En la implementación de experimentos que miden niveles de expresión por qPCR, se utilizan las gráficas de eficiencia para saber a qué concentraciones de cDNA es preciso comparar los niveles de expresión entre el gen de interés con el gen de referencia. Esto se observa en una gráfica de eficiencia en la cual se grafican los resultados del gen de referencia y los del gen de interés, los puntos que estén más cerca, casi uno sobre el otro, indican que a esas concentraciones de DNA es posible comparar los niveles de expresión de una forma precisa. Lo mismo sucede en nuestro ensayo, en donde la eficiencia del oligo M y U debe ser comparable para poder tener resultados precisos en la cuantificación. En la figura 8, se señala el rango de los niveles de metilación a los cuales las eficiencias son muy similares y en la mayoría de los casos caen en valores de metilación entre el 30 % y 70 %. Por lo que la sensibilidad del ensayo se a valores de metilación menores al 29 % y mayores al 80 %, por lo tanto, en esos rangos no se puede utilizar con precisión la comparación entre el valor de Ct del oligo M con el U.

Para el gen NR2E1 los valores de metilación que se reportaron en el estudio de referencia fueron del 50 % al 75 %, de acuerdo a los resultados obtenidos en la figura 8, los valores de metilación a los cuales se obtienen resultados precisos van del 60 % al 80 % de metilación, por lo que el cálculo de los valores de metilación del 50 % ya no son confiables. Para el gen NFIX, reportaron valores de metilación del 30 % al 50 %, y el nivel de detección confiable está entre el 40 % y 60 %, quedando fuera del rango confiable los valores del 30 %. Para el gen KCNQ1 reportaron valores de metilación de entre el 50 % y 60 %, los niveles confiables de comparación estuvieron entre 40 % y 60 %, por lo que los niveles de metilación que se obtuvieron en la prueba son precisos, esto se refleja en el valor de R^2 de la figura 10, siendo el valor más alto de dicho parámetro que se obtuvo para los cuatro genes. Por último, para el gen FTO reportaron valores de metilación del 50 % al 70 %, y los valores a los cuales se encontraron eficiencias adecuadas fueron entre el 30 % y 50 %, por lo que la cuantificación de los valores del 60 % y 70 % no son confiables; sin embargo, se obtuvo una buena correlación (Figura 10). Esto puede ser porque a esos valores de metilación la variación no es muy grande, observándose en la distancia entre los puntos de las dos curvas (Figura 8), los cuales no están muy alejados. Aunque los resultados del estudio de referencia no son comparables con los de la estandarización, por no tratarse de las muestras de análisis, es necesario tomarlos en cuenta para conocer a qué valores de metilación se pierde la sensibilidad del ensayo. Es por esto, que una parte de la variación de los resultados obtenidos, puede explicarse por la baja sensibilidad a ciertos valores de metilación.

La eficiencia de la PCR solo se determinó para saber si el rendimiento de la reacción era el adecuado y no con fines de utilizarlos para la cuantificación, ya que se tendrían que hacer curvas estándar para cada muestra lo cual no resulta factible para el análisis de varias muestras de DNA, por lo que para la cuantificación se utilizó un modelo sigmoideo basado en la cinética de la reacción de qPCR, del cual se profundizará más adelante.

En las gráficas de eficiencia también se determinó el valor de R^2 el cual se calculó para conocer el ajuste de los datos el cual mostró ser adecuado. Este valor también se utiliza como medida de la reproducibilidad, lo que permite establecer si a lo largo del tiempo se mantiene la consistencia y la exactitud de los resultados.

9.3 Estrategia de cuantificación por qPCR

El método matemático más utilizado en la cuantificación por qPCR se basa en la comparación de los valores de Ct ($\Delta\Delta Ct$), el cual utiliza un modelo matemático de no convergencia que solo se ajusta a la fase inicial de la reacción para modelar la cinética de la PCR. Este método se basa en las suposiciones de que las eficiencias de amplificación del gen de referencia y del gen objetivo son aproximadamente iguales y que la eficiencia de amplificación es cercana a 1, en la fase exponencial, ya que en esta fase se supone que los componentes de la reacción no son limitantes y por lo tanto la eficiencia de amplificación es idéntica (Rao X., et al., 2013). Sin embargo, en un estudio en el que pusieron a prueba los dos supuestos anteriores, encontraron que la eficiencia de amplificación no siempre es cercana a 1 y que las eficiencias de amplificación del gen de referencia y el gen objetivo no siempre son aproximadamente iguales (Liu W. y Saint D.A., 2002). Por lo que propusieron un método de cuantificación basado en la eficiencia de amplificación que toma en cuenta la cinética de la reacción de PCR, el cual muestra resultados óptimos en la eficiencia de amplificación en todas las fases de la reacción, por lo que se decidió utilizar dicho método para la cuantificación de la metilación.

Para poder probar si dicho método era útil para este estudio, se evaluó si la tendencia de la gráfica de amplificación es igual cuando se sustituyen los valores de concentración de DNA por los de metilación y los de Ct por los de ΔCt . Para ello primero se construyó una tabla con valores de metilación y Ct, teóricos (Tabla 21). La tabla se construyó partiendo del principio de amplificación por PCR, el cual dice que en cada ciclo se obtiene el doble de moléculas de DNA. Este principio se siguió, pero en términos de porcentaje de metilación. Para describir lo que se hizo se ejemplificará con la amplificación del oligo M.

El punto de partida fue el valor de metilación del 50 %, en el cual se supone que los valores de Ct de la amplificación con ambos oligos es el mismo. El valor que se determinó fue arbitrario tomando en cuenta que la amplificación ideal inicia a partir del ciclo 20. Para determinar los valores que están por debajo del 50 % y por arriba de este mismo, se fue aumentando y disminuyendo la mitad del valor de metilación, que es 25 y se observó que cuando se aumenta el 25 % de metilación el valor de Ct sólo disminuye a la mitad, y cuando se resta el 25 % el valor de Ct aumenta un ciclo. En el caso del oligo U se siguió la misma lógica, sólo que los valores de Ct son inversos a los del oligo M, ya que para su amplificación se requieren de más ciclos. La tendencia de la gráfica es sigmoidea porque conforme aumenta el valor de metilación, el valor de Ct de la amplificación con el oligo M es más pequeño, y el de la amplificación con el oligo U es más grande, por lo que el valor de ΔCt se va haciendo negativo (Figura 6).

Como los resultados teóricos resultaron ser los esperados se realizó una prueba con el DNA artificial que se construyó a partir de valores de metilación conocidos para cada uno de los genes y lo que se observó fue la misma tendencia sigmoidea, como se esperaba (Figura 9).

El último paso consistió en evaluar la calidad de los resultados obtenidos, al compararlos con los valores de metilación conocidos. Para ello se construyeron las gráficas de correlación para cada gen (Figura 10), y se calculó el valor de R^2 , el cual mostró valores cercanos a 1, lo cual es indicativo de que los valores de metilación calculados son muy parecidos a los conocidos. Las gráficas

mostradas son la evidencia del buen funcionamiento del método y que por medio de éste es posible obtener valores de metilación cercanos a los reales.

9.4 Análisis de metilación en genes candidato

La creciente prevalencia de la obesidad en nuestro país y en el mundo, se reconoce como un riesgo importante en el desarrollo de enfermedades que comprometen la salud metabólica, como la DT2 y la dislipidemia. La dislipidemia en conjunto con la obesidad, predisponen un incremento en el riesgo de enfermedad cardiovascular, una de las principales causas de muerte en el mundo (OMS, 2016). Siendo la reducción de peso el principal tratamiento de las enfermedades asociadas a la obesidad, ya que se ha visto que después de la pérdida de peso se recupera la salud metabólica, reduciéndose el riesgo cardiovascular y mortalidad asociadas a la epidemia de la obesidad. Las estrategias convencionales como modificaciones en la dieta y el ejercicio, resultan ser insuficientes en el tratamiento de la obesidad severa, por lo que los procedimientos quirúrgicos, como la cirugía bariátrica, han resultado ser eficaces en el tratamiento de la obesidad y sus comorbilidades. En el caso de la dislipidemia se ha reportado que después de la cirugía se presenta una disminución en los niveles de CT, TG, c-LDL y un aumento del c-HDL (Zlabek J.A, et al., 2005). El mecanismo por el cual ocurre esto no ha sido completamente dilucidado.

En investigaciones recientes sobre el papel de los mecanismos epigenéticos en la patogénesis de enfermedades humanas comunes, como son la obesidad y la diabetes, han demostrado que la regulación epigenética a través de la metilación del DNA, se ha visto implicada en el control transcripcional de genes relacionados con la función mitocondrial y la regulación metabólica en músculo esquelético y células β del páncreas (Barres R., et al., 2013). Por lo que se piensa que dicho mecanismo epigenético puede tener un papel en la patogénesis de la dislipidemia y en la mejora clínica.

Los estudios sobre el papel de la metilación del DNA en la dislipidemia son escasos y los pocos que han realizado muestran que existen alteraciones en los niveles de metilación de genes relacionados con el metabolismo de lípidos en tejido adiposo subcutáneo. En un estudio reciente, reportaron que después de la reducción de peso por cirugía bariátrica, se presentan cambios en los patrones de metilación en tejido adiposo subcutáneo y que dichas modificaciones muestran una correlación con la mejora en los parámetros clínicos de lípidos e IMC (Sánchez EC., 2017). De los genes descritos en el estudio anterior se seleccionaron algunos de los que tuvieron las mejores correlaciones de los niveles de metilación con los parámetros clínicos de lípidos e IMC. El análisis se realizó en los mismos sitios CpG y pacientes, por lo que se esperaba observar que las diferencias en los valores de metilación entre el grupo de pacientes OB y PQX fueran significativas. A pesar de que las diferencias entre los grupos no fueron significativas (Figuras 13, 14, 15 y 16), si se pudo observar el cambio en los niveles de metilación antes y después de la cirugía.

Los cambios en la metilación de los genes *FTO* y *KCNQ1* han sido reportados en varios estudios sobre obesidad y diabetes. En uno de ellos se encontró que los valores de metilación para el gen *KCNQ1* y el mismo sitio CpG, coinciden con los reportados en este estudio. El análisis de metilación lo realizaron en muestras de tejido adiposo provenientes de pacientes obesos antes de ser sometidos a cirugía bariátrica y 6 meses después de ésta (Benton M.C., et al., 2015). En este mismo estudio también encontraron cambios significativos en la metilación del gen *FTO*, pero en un sitio

CpG diferente al de nuestro estudio. Sin embargo, coinciden en la relevancia de dicho gen en la remodelación de la cromatina después de la pérdida de peso.

La participación de los genes *NFIX* y *NR2E1* no ha sido descrita por otros estudios en enfermedades de tipo metabólico. Sin embargo, se sabe que la expresión del gen *NFIX* en tejido adiposo, en individuos metabólicamente sanos, es elevada, lo que indica que desempeña un papel importante en tejido adiposo. Como este gen codifica para factores de transcripción, se piensa que alteraciones en su expresión pueden repercutir en la transcripción de genes importantes que participan en el metabolismo del colesterol HDL y LDL.

Para poder atribuir la influencia de la metilación del DNA en la expresión de un gen se debe conocer la posición de los sitios CpG que se evaluaron. Para este estudio, tres de los sitios CpG que se analizaron, se encontraron en el cuerpo de los genes *NR2E1*, *NFIX* y *FTO*. La metilación en el cuerpo génico no está asociada con la represión, sino que muestra una correlación positiva con la expresión génica. Además, se ha visto que puede interferir con el alargamiento de la transcripción, lo que sugiere un posible papel en la regulación del splicing (Jjingo D., et al., 2012), por lo que los transcritos de dichos genes pueden generar moléculas que participan de forma negativa en el metabolismo lipídico cuando los niveles de metilación son elevados.

El sitio CpG que se analizó en el gen *KCNQ1* se encontró en el TSS1500 (a 1500 bases del sitio de inicio de la transcripción). Como se ha explicado, la metilación en este sitio está asociada a la represión transcripcional.

El tejido adiposo contiene varios tipos de células diferentes incluyendo; adipocitos, fibroblastos, pre adipocitos, células madre y células inmunitarias; de dicho medio celular se ha reportado que después de la pérdida de peso cambia significativamente (Benton M.C., et al., 2015). Lo que sugiere que una proporción de las modificaciones observadas en la metilación del DNA podría reflejar dichos cambios en la composición celular, lo cual puede estar relacionado con las diferencias biológicas y funcionales relacionadas con la mejora de las enfermedades asociadas a la obesidad. Este supuesto parte del conocimiento de que las marcas epigenéticas, como la metilación del DNA, desempeñan un papel importante en el desarrollo y la diferenciación de las células. Es por ello que no se puede atribuir la participación específica de los genes en algún tipo celular, por lo que el reto de los análisis futuros es centrarse en analizar la regulación específica que ocurre en tipos de células particulares, como adipocitos o macrófagos del tejido adiposo, y su contribución en las enfermedades.

10. Conclusiones

- Se logró implementar la técnica MSP, la cual mostró tener buena eficiencia y especificidad analítica.
- Se demostró que el método MSP permite obtener valores de metilación cercanos a los valores reales.
- Se logró el análisis cuantitativo de la metilación de sitios CpG de los genes *NR2E1*, *NFIX*, *KCNQ1* y *FTO*.
- Los cambios que se observaron en los niveles de metilación de los genes *NR2E1*, *NFIX*, *KCNQ1* y *FTO* en tejido adiposo después de cirugía bariátrica, no resultaron ser significativos entre los grupos de pacientes.

11. Referencias

- Asselbergs, F. W., Guo, Y., van Iperen, E. P. A., Sivapalaratnam, S., Tragante, V., Lanktree, M. B., Drenos, F., et al. (2012). Large-Scale Gene-Centric Meta-analysis across 32 Studies Identifies Multiple Lipid Loci. *American Journal of Human Genetics*, *91*(5), 823–838. <http://doi.org/10.1016/j.ajhg.2012.08.032>
- Bahia, L., Coutinho, E. S., Barufaldi, L. A., Abreu, G. de A., Malhão, T. A., Souza, C. P. R. de, & Araujo, D. V. (2012). The costs of overweight and obesity-related diseases in the Brazilian public health system: cross-sectional study. *BMC Public Health*, *12*(440), 1–7. <https://doi.org/10.1186/1471-2458-12-440>
- Barquera, S., Hernández-Barrera, L., Campos-Nonato, I., Espinosa, J., Flores, M., Barriguete, A., & Rivera, J. a. (2009). Energy and nutrient consumption in adults: Analysis of the mexican national health and nutrition survey 2006. *Salud Pública de México*, *51*(4), 562–573. <https://doi.org/10.1590/S0036-36342009001000011>
- Barrera-cruz, A., Molina-ayala, M. A., & Rodríguez-gonzález, A. (2013). Escenario actual de la obesidad en México. *Revista Medica Del Instituto Mexicano Del Seguro Social*, *51*(3), 292–299. <https://doi.org/http://www.medigraphic.com/pdfs/imss/im-2013/im133k.pdf>
- Barres, R., Kirchner, H., Rasmussen, M., Yan, J., Kantor, F., Krook, A., Zierath, J., et al. (2013). Weight Loss after Gastric Bypass Surgery in Human Obesity Remodels Promoter Methylation. *Cell Reports*, *3*(4), 1020–1027. <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2013.03.018>
- Barres, R., Yan, J., Egan, B., Treebak, J. T., Rasmussen, M., Fritz, T., Zierath, J. R., et al. (2012). Acute exercise remodels promoter methylation in human skeletal muscle. *Cell Metabolism*, *15*(3), 405–411. <https://doi.org/10.1016/j.cmet.2012.01.001>
- Begum, G., Stevens, A., Smith, E. B., Connor, K., Challis, J. R. G., Bloomfield, F., & White, A. (2012). Epigenetic changes in fetal hypothalamic energy regulating pathways are associated with maternal undernutrition and twinning. *The FASEB Journal*, *26*(4), 1694–1703. <http://doi.org/10.1096/fj.11-198762>
- Bell, C. G., Finan, S., Lindgren, C. M., Wilson, G. A., Rakyán, V. K., Teschendorff, A. E., Hitman, G. A., et al. (2010). Integrated Genetic and Epigenetic Analysis Identifies Haplotype-Specific Methylation in the *FTO* Type 2 Diabetes and Obesity Susceptibility Locus. *PLoS ONE*, *5*(11), e14040. <http://doi.org/10.1371/journal.pone.0014040>
- Benton, M. C., Johnstone, A., Eccles, D., Harmon, B., Hayes, M. T., Lea, R. A., Macartney-Coxson, D., et al. (2015). An analysis of DNA methylation in human adipose tissue reveals differential modification of obesity genes before and after gastric bypass and weight loss. *Genome Biology*, *16*, 8. <https://doi.org/10.1186/s13059-014-0569-x>
- Buchwald, H., Avidor, Y., Braunwald, E., Jensen M.D., Pories, W., Fahrbach, K., & Schoelles, K. (2004). Bariatric Surgery A Systematic Review and Meta-analysis. *JAMA*, *292*(14):1724-1737. [doi:10.1001/jama.292.14.1724](https://doi.org/10.1001/jama.292.14.1724)

- Canalizo, E., Favela, E., Salas, J., Gómez, R., Jara, R., Torres, L., & Viniegra, A. (2013). Guía de práctica clínica: Diagnóstico y tratamiento de las dislipidemias. *Revista Médica Mexicana Del Seguro Social*, 51(6), 700–709. Obtenido de: <http://www.medigraphic.com/pdfs/imss/im-2013/im136t.pdf>
- Cavagnari, B. M. (2012). Regulación de la expresión génica: cómo operan los mecanismos epigenéticos. *Arch Argent Pediatr*, 110(2), 132–136. <https://doi.org/10.5546/aap.2012.132>
- Cummings, D. E., & Schwartz, M. W. (2003). Genetics and pathophysiology of human obesity. *Annual Review of Medicine*, 54(August), 453–471. <https://doi.org/10.1146/annurev.med.54.101601.152403>
- Dávila-Torres, J., González-Izquierdo, J., & Barrera-Cruz, A. (2015). Panorama de la obesidad en México. *Revista Médica Del Instituto Mexicano Del Seguro Social*, 53(2), 240–249.
- ERFC (The Emerging Risk Factors Collaboration). (2009). Lipoprotein(a) Concentration and the Risk of Coronary Heart Disease, Stroke, and Nonvascular Mortality. *JAMA : The Journal of the American Medical Association*, 302(4), 412–423. <http://doi.org/10.1001/jama.2009.1063>
- Fakruddin, M., Chowdhury, A., Hossain, M. N., Mannan, K. S. Bin, & Mazumdar, R. M. (2012). Pyrosequencing-Principles and Applications. *International Journal of Life Science & Pharma Research*, 2(2), L65-76.
- Feero, W. G., Guttmacher, A. E., & McCarthy, M. I. (2010). Genomics, Type 2 Diabetes, and Obesity. *New England Journal of Medicine*, 363(24), 2339–2350. <https://doi.org/10.1056/NEJMra0906948>
- Feero, W. G., Guttmacher, A. E., & McCarthy, M. I. (2010). Genomics, Type 2 Diabetes, and Obesity. *New England Journal of Medicine*, 363(24), 2339–2350. <https://doi.org/10.1056/NEJMra0906948>
- Fermín I, M. Y., & J Alfredo, M. H. (2013). Epigenética en obesidad y diabetes tipo 2: papel de la nutrición, limitaciones y futuras aplicaciones. *Rev. Chil. Endocrinol. Diabetes*, 6(3), 108–114.
- Francisco, A. (2007). www.medigraphic.com Prevalencia y comorbilidad de dislipidemias en el primer nivel de atención. *Rev Med Inst Mex Seguro Soc*, 45(5), 469–475.
- Franssen, R., Monajemi, H., Stroes, E. S. G., & Kastelein, J. J. P. (2011). Obesity and Dyslipidemia. *Medical Clinics of North America*, 95(5), 893–902. <https://doi.org/10.1016/j.mcna.2011.06.003>
- Galm O., Herman J.G. (2005) Methylation-Specific Polymerase Chain Reaction. In: Brown R.D., Ho P.J. (eds) Multiple Myeloma. *Methods in Molecular Medicine™*, vol 113. Humana Press
- García-Giustiniani, D., & Stein, R. (2016). Genetics of Dyslipidemia. *Arquivos Brasileiros de Cardiologia*, 434–438. <https://doi.org/10.5935/abc.20160074>
- Gerken, T., Girard, C. A., Tung, Y. L., Webby, C. J., Saudek, V., Hewitson, K. S., Schofield, C. J., et al. (2007). The Obesity-Associated FTO Gene Encodes a 2-Oxoglutarate – Dependent Nucleic Acid Demethylase. *Science*, 318(6011), 1469–1472. <https://doi.org/10.1126/science.1151710>
- Goldberg, I. J., Eckel, R. H., & Abumrad, N. a. (2009). Regulation of fatty acid uptake into tissues: lipoprotein lipase- and CD36-mediated pathways. *Journal of Lipid Research*, 50 Suppl, S86-90. <https://doi.org/10.1194/jlr.R800085-JLR200>

- González, A. F., (2011). Dislipidemia y factores de riesgo cardiovascular. *Lancet*, 1-9. Obtenido de: www.lancet.mx/FASCICULOS/.../Dislipidemia%20y%20factores%20de%20riesgo.pdf
- Gutiérrez, J. P., Rivera-Dommarco, J., Shamah-Levy, T., Villalpando-Hernández, S., Franco, A., Cuevas-Nasu, L., Romero-Martínez, M., et al. (2012). Encuesta Nacional de Salud y Nutrición 2012. Resultados Nacionales. Cuernavaca, México: Instituto Nacional de Salud Pública. Obtenido de: <http://ensanut.insp.mx/informes/ENSANUT2012ResultadosNacionales.pdf>
- Herbert, A., Gerry, N., McQueen, M. B., Heid, I. M., Pfeufer, A., Illig, T., Christman, M. F., et al. (2006). A Common Genetic Variant is Associated with Adult and Childhood Obesity. *Science*, 312(April), 279–283. <https://doi.org/10.1126/science.1124779>
- Instituto Nacional de Investigación del Genoma Humano. Glosario Hablado de Términos Genéticos. Consultado el 06 de abril 2017, desde <https://www.genome.gov/glossarys/index.cfm?id=91>
- Jarick, I., Vogel, C. I. G., Scherag, S., Schäfer, H., Hebebrand, J., Hinney, A., & Scherag, A. (2011). Novel common copy number variation for early onset extreme obesity on chromosome 11q11 identified by a genome-wide analysis. *Human Molecular Genetics*, 20(4), 840–852. <https://doi.org/10.1093/hmg/ddq518>
- Jin, B., Li, Y., & Robertson, K. D. (2011). DNA Methylation: Superior or Subordinate in the Epigenetic Hierarchy? *Genes & Cancer*, 2(6), 607–617. <http://doi.org/10.1177/1947601910393957>
- Jjingo, D., Conley, A. B., Yi, S. V., Lunyak, V. V., & Jordan, I. K. (2012). On the presence and role of human gene-body DNA methylation. *Oncotarget*, 3(4), 462–474.
- Klop, B., Elte, J. W. F., & Cabezas, M. C. (2013). Dyslipidemia in Obesity: Mechanisms and Potential Targets. *Nutrients*, 5(4), 1218–1240. <https://doi.org/10.3390/nu5041218>
- Laird, P. W. (2010). Principles and challenges of genomewide DNA methylation analysis. *Nature Reviews Genetics*, 11(3), 191–203. <https://doi.org/10.1038/nrg2732>
- Laker, R. C., Wlodek, M. E., Connelly, J. J., & Yan, Z. (2013). Epigenetic origins of metabolic disease: The impact of the maternal condition to the offspring epigenome and later health consequences. *Food Science and Human Wellness*, 2(1), 1–11. <https://doi.org/10.1016/j.fshw.2013.03.002>
- Li LC & Dahiya R. (2002). MethPrimer: designing primers for methylation PCRs. *Bioinformatics*. Nov;18(11):1427-31. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/18.11.1427>
- Li, Y., & Tollefsbol, T. O. (2011). DNA methylation detection: Bisulfite genomic sequencing analysis. *Methods in Molecular Biology (Clifton, N.J.)*, 791, 11–21. http://doi.org/10.1007/978-1-61779-316-5_2
- Liu, W., & Saint, D. A. (2002). Validation of a quantitative method for real time PCR kinetics. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 294(2), 347–353. [https://doi.org/10.1016/S0006-291X\(02\)00478-3](https://doi.org/10.1016/S0006-291X(02)00478-3)
- López Alvarenga, J. C., & González-García, L. T. (2001). Enfermedades asociadas a la obesidad. *Revista de Endocrinología Y Nutrición Revista de Endocrinología Y Nutrición Abril-Junio*, 9(2), 77–85.

- Malis, C., Rasmussen, E. L., Poulsen, P., Petersen, I., Christensen, K., Beck-Nielsen, H., Vaag, A., et al. (2005). Total and regional fat distribution is strongly influenced by genetic factors in young and elderly twins. *Obesity Research*, *13*(12), 2139–2145. <https://doi.org/10.1038/oby.2005.265>
- Martínez, A.F., & Chávez, R. (2007). Prevalencia y comorbilidad de dislipidemias en el primer nivel de atención. *Rev Med Inst Mex Seguro Soc.*; *45* (5): 469-475
- Martínez, J. A., Milagro, F. I., Claycombe, K. J., & Schalinske, K. L. (2014). Epigenetics in Adipose Tissue , Obesity , Weight Loss , and Diabetes 1 , 2. *Advances in Nutrition*, *5*, 71–81. <https://doi.org/10.3945/an.113.004705.71>
- Milagro F. I., Mansego M. L., De Miguel C., & Martínez J. A. (2013). Dietary factors, epigenetic modifications and obesity outcomes: Progresses and perspectives. *Mol Aspects Med.*; *34*(4):782–812. doi:10.1016/j.mam.2012.06.010.
- Mohtat, D., & Susztak, K. (2010). Fine tuning gene expression: The epigenome. *Seminars in Nephrology*, *30*(5), 468–476. <https://doi.org/10.1016/j.semnephrol.2010.07.004>
- Ocaña, S. C., & Martínez, M. S. (2011). Genética y obesidad, *78*(4), 230–239.
- OMS (2016) Organización Mundial de la Salud. Obesidad y sobrepeso. 10 datos sobre la obesidad [en línea]. abril 2017. Disponible en <http://www.who.int/features/factfiles/obesity/es/>
- Orozco, L., Graciela, A. & Barajas, F. (2014). Genómica de las enfermedades metabólicas. *Revista Digital Universitaria*, *15*, 1–15.
- Pidsley, R., Zotenko, E., Peters, T. J., Lawrence, M. G., Risbridger, G. P., Molloy, P., Kent, W., et al. (2016). Critical evaluation of the Illumina MethylationEPIC BeadChip microarray for whole-genome DNA methylation profiling. *Genome Biology*, *17*(1), 208. <https://doi.org/10.1186/s13059-016-1066-1>
- Portela, A., & Esteller, M. (2010). Epigenetic modifications and human disease. *Nature Biotechnology*, *28*(10), 1057–1068. <https://doi.org/10.1038/nbt.1685>
- Ramachandrappa, S., & Farooqi, I. S. (2011). Genetic approaches to understanding human obesity. *J Clin Invest*, *121*(6), 2080–2086. <https://doi.org/10.1172/JCI46044.2080>
- Rao, X., Huang, X., Zhou, Z., & Lin, X. (2013). An improvement of the $2^{-\Delta\Delta CT}$ method for quantitative real-time polymerase chain reaction data analysis. *Biostatistics, Bioinformatics and Biomathematics*, *3*(3), 71–85.
- Reed, K., Poulin, M. L., Yan, L., & Parissenti, A. M. (2010). Comparison of bisulfite sequencing PCR with pyrosequencing for measuring differences in DNA methylation. *Analytical Biochemistry*, *397*(1), 96–106. <https://doi.org/10.1016/j.ab.2009.10.021>
- Rönn, T., Volkov, P., Davegårdh, C., Dayeh, T., Hall, E., Olsson, A. H., Ling, C., et al. (2013). A Six Months Exercise Intervention Influences the Genome-wide DNA Methylation Pattern in Human Adipose Tissue. *PLoS Genetics*, *9*(6), e1003572. <http://doi.org/10.1371/journal.pgen.1003572>

- Rotondo, D., & Davidson, J. (2010). Genetics and molecular biology: identification of dyslipidemia genes. *Current Opinion in Lipidology*, 21(6), 548–9. <https://doi.org/10.1097/MOL.0b013e3283404fde>
- Salinas, V. H. (2013). *La epigenética en la regulación de la expresión génica*. (Tesis de licenciatura). UNAM. México.
- Sánchez, E. C. (2017). *Remodelación de la metilación del DNA y su correlación con niveles séricos de lípidos en pacientes sometidos a cirugía bariátrica*. (Tesis de maestría). UNAM. México.
- Sayols-Baixeras, S., Irvin, M. R., Elosua, R., Arnett, D. K., & Aslibekyan, S. W. (2016). Epigenetics of Lipid Phenotypes. *Current Cardiovascular Risk Reports*, 10(10), 1–7. <https://doi.org/10.1007/s12170-016-0513-6>
- Schwarzova, L., Hubacek, J. A., & Vrablik, M. (2015). Genetic Predisposition of Human Plasma Triglyceride Concentrations, 64.
- Schwenk, R. W., Vogel, H., & Schürmann, A. (2013). Genetic and epigenetic control of metabolic health. *Molecular Metabolism*, 2(4), 337–347. <https://doi.org/10.1016/j.molmet.2013.09.002>
- Secretaría de Salud. Acuerdo Nacional para la Salud Alimentaria. Estrategia contra el sobrepeso y la obesidad. Programa de Acción en el Contexto Escolar. México: Secretaría de Salud; 2010. Disponible en http://www.sep.gob.mx/work/models/sep1/Resource/635/1/images/programadeaccion_sept.pdf
- Siqueira, J. F., Fouad, A. F., & Rôças, I. N. (2012). Pyrosequencing as a tool for better understanding of human microbiomes. *Journal of Oral Microbiology*, 4, 10.3402/jom.v4i0.10743. <http://doi.org/10.3402/jom.v4i0.10743>
- Spracklen, C. N., Chen, P., Kim, Y. J., Wang, X., Cai, H., Li, S., Sim, X., et al. (2017). Association analyses of East Asian individuals and trans-ancestry analyses with European individuals reveal new loci associated with cholesterol and triglyceride levels. *Human Molecular Genetics*, 26(9), 1770–1784. <https://doi.org/10.1093/hmg/ddx062>
- Stirzaker, C., Taberlay, P. C., Statham, A. L., & Clark, S. J. (2014). Mining cancer methylomes: Prospects and challenges. *Trends in Genetics*, 30(2), 75–84. <https://doi.org/10.1016/j.tig.2013.11.004>
- Sturgeon, S. R., Balasubramanian, R., Schairer, C., Muss, H. B., Ziegler, R. G., & Arcaro, K. F. (2012). Detection of promoter methylation of tumor suppressor genes in serum DNA of breast cancer cases and benign breast disease controls. *Epigenetics*, 7(11), 1258–1267. <http://doi.org/10.4161/epi.22220>
- Svec, D., Tichopad, A., Novosadova, V., Pfaffl, M. W., & Kubista, M. (2015). How good is a PCR efficiency estimate: Recommendations for precise and robust qPCR efficiency assessments. *Biomolecular Detection and Quantification*, 3, 9–16. <https://doi.org/10.1016/j.bdq.2015.01.005>
- Tejero, M. E. (2008). Genética de la Obesidad. *Boletín Médico Del Hospital Infantil de México*, 65(6), 441–450.

Vegiopoulos, A., & Herzig, S. (2007). Glucocorticoids, metabolism and metabolic diseases. *Molecular and Cellular Endocrinology*, 275(1–2), 43–61. <https://doi.org/10.1016/j.mce.2007.05.015>

Wang, J., Yu, M., Li, K., Xiao, J., & Zhou, Y. (2009). Improved PCR-BSP assay for multiplex methylation pattern analysis in minimal amount of DNA. *Molecular Biotechnology*, 42(3), 333–340. <https://doi.org/10.1007/s12033-009-9169-5>

Weiss, L. A., Pan, L., Abney, M., & Ober, C. (2006). The sex-specific genetic architecture of quantitative traits in humans. *Nat Genet*, 38(2), 218–222. <https://doi.org/papers2://publication/doi/10.1038/ng1726>

Zlabek, J. A., Grimm, M. S., Larson, C. J., Mathiason, M. A., Lambert, P. J., & Kothari, S. N. (2005). The effect of laparoscopic gastric bypass surgery on dyslipidemia in severely obese patients. *Surgery for Obesity and Related Diseases*, 1(6), 537–542. <https://doi.org/10.1016/j.soard.2005.09.009>